

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie der Hornhaut der Haussäugetiere**

—  
**Eine immunhistochemische und rasterelektronenmikroskopische Studie**

von

**Achim Bauer**

aus Schwäbisch Hall

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am  
Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik  
der Universität Hohenheim  
Lehrstuhl für Anatomie und Physiologie der Haustiere

Mentor: Univ.-Prof Dr. W. M. Amselgruber

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin

**Tag der Promotion:** 31. Januar 2015

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
2.1	Embryologie .....	2
2.2	Makroskopische Anatomie.....	4
2.2.1	Morphologie des Auges .....	4
2.2.2	Gefäßversorgung .....	7
2.2.3	Nervenversorgung .....	8
2.3	Anatomie der Hornhaut .....	9
2.3.1	Makroskopie .....	9
2.3.2	Mikroskopie .....	10
2.4	Physiologie der Hornhaut.....	15
2.5	Cytokeratine .....	18
2.6	p63.....	19
2.7	Mitosemarker-Proteine.....	20
2.7.1	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) .....	20
2.7.2	Phosphohiston H3 (PHH3).....	21
2.8	Claudin-1 .....	22
2.9	Aquaporine .....	23
2.10	Elastin.....	24
2.11	Kollagen Typ VIII.....	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1	Untersuchungsmaterial .....	27
3.2	Probenentnahme und Probenaufbereitung .....	27
3.3	Histologie .....	28
3.4	Immunhistochemische Färbungen.....	29
3.5	Rasterelektronenmikroskopie.....	32
3.6	Licht- und rasterelektronenmikroskopische Auswertung.....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1	Histomorphologie.....	34
4.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	43

4.3	Immunhistochemie .....	49
4.3.1	Cytokeratine .....	49
4.3.2	p63 .....	53
4.3.3	Mitosemarker (PCNA und PHH3) .....	55
4.3.4	Claudin-1 .....	57
4.3.5	Aquaporine .....	58
4.3.6	Elastin .....	61
4.3.7	Kollagen Typ VIII .....	61
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>77</b>
8.1	Literaturverzeichnis .....	77
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	105
8.3	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	107
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>116</b>

# 1 Einleitung

Die Hornhaut ist ein einzigartiges Gewebe. Durch ihre besonderen Eigenschaften gelingt es ihr, transparent und gleichzeitig widerstandsfähig zu sein. Eine gesunde, intakte Hornhaut ist für eine optische Wahrnehmung von entscheidender Bedeutung. Sie bündelt die einfallenden Lichtstrahlen etwa doppelt so stark wie die Linse und projiziert sie auf die Netzhaut, wodurch das Sehen ermöglicht wird. Neben den optischen Fähigkeiten bildet die Hornhaut eine für das Auge wichtige Barriere und schützt dieses effektiv vor äußeren Umwelteinflüssen. Lange Zeit konnte man sich die vielfältigen Eigenschaften der Hornhaut nicht erklären, weshalb in verschiedenen Teilgebieten intensive Forschung betrieben wurde, um die Struktur und Funktion der physiologischen Hornhaut zu verstehen. Die Erkenntnisse stützen sich überwiegend auf Untersuchungen an Versuchstieren und Menschen. Vor dem Hintergrund, dass in der Veterinärmedizin viele Patienten mit Veränderungen der Hornhaut behandelt werden, gewinnt das Wissen über den morphologischen Aufbau der Hornhaut auch bei unseren Haussäugetieren an Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Licht- und Rasterelektronenmikroskopie, die morphologischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Hornhaut von den Haussäugetieren Schwein, Rind, Ziege, Pferd, Hund und Katze detailliert darzustellen. Ein weiterer Schwerpunkt soll auf den Nachweis von Struktur- und Transmembranproteinen sowie Proliferationsmarkerproteinen gelegt werden, um ein besseres Verständnis der funktionellen Eigenschaften der Hornhaut zu erhalten.

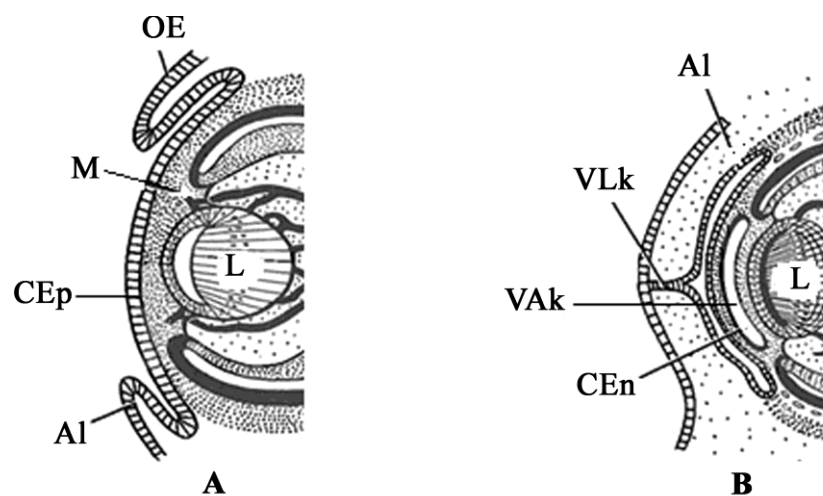
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Embryologie

Die Anlage des Auges entsteht aus dem äußeren Keimblatt des Neuralrohres (Neuroektoderm), der äußersten Schicht des Keimblattes (Oberflächenektoderm) und dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) (Dyce et al., 1991). Beidseits des Zwischenhirnes (*Diencephalon*) stülpt sich jeweils ein Augenbläschen (*Vesicula optica*) hervor, welches über den Augenblasenstiel (*Pedunculus opticus*) mit dem dritten Hirnventrikel kommuniziert (Schnorr, 1985). Das Mesenchym wird dabei gegen das Oberflächenektoderm geschoben, wodurch ein enger Kontakt zwischen beiden Geweben entsteht. Dies veranlasst dort die Entwicklung der Linsenplakode, indem das Oberflächenektoderm zu proliferieren beginnt und das *Mesenchym* nahezu vollständig schwindet (Newsome, 1979). Aus der Linsenplakode entsteht durch Abspaltung von der Oberhaut (*Epidermis*) im Laufe der Embryonalentwicklung die Linse. Diese Linsenanlage ist entscheidend für die Induktion der Hornhautentwicklung (Dyce et al., 1991; Davies et al., 2009). An der Bildung der Hornhaut ist neben dem Mesenchym auch das Oberflächenektoderm beteiligt (Brini et al., 1966; Bistner et al., 1973). Zuerst formt sich aus dem mesenchymalen Gewebe, das sich ausgehend von der Peripherie hinter die *Epidermis* schiebt, die primitive Hornhaut (*Cornea*) (Zietschmann und Krölling, 1955). Das lockere Mesenchym bildet neben der Hornhaut auch die Grundlage für die Lederhaut des Auges (*Sclera*), die gemeinsam die äußere Augenhaut (*Tunica externa*) darstellen (Glücksman, 1929). Zwischen dem Mesenchym der primitiven Hornhaut und der Linse spaltet sich als dünne Schicht das Hornhautendothel (*Endothelium camerae anterioris*) ab, wodurch die vordere Augenkammer (*Camera anterior bulbi*) entsteht (Dyce et al., 1991). Somit wird die *Cornea* über das Endothel zur vorderen Augenkammer abgegrenzt (Sinowatz, 1991). Zur Abgrenzung wandern Mesenchymzellen aus der perilimbalen Zone zentral ein und bilden die Endothelzellschicht (O’Rahilly und Meyer, 1959). Aus dem Mesenchym der primitiven Hornhaut, welches sich dem Oberflächenektoderm anlegt, formt sich die Eigenschicht (*Substantia propria*, Stroma) der Hornhaut (Abb.1). Die Mesenchymzellen, die sich überwiegend zu länglichen Keratoblasten differenzieren, produzieren Mukopolysaccharide wie Chondroitin-4-sulfat oder Keratansulfat sowie Kollagen, welche das primäre, noch opake Hornhautstroma formen (Hay, 1980; Sinowatz, 1991). Durch die



corneale Dehydratation, die im Zuge der allgemeinen embryonalen Dehydratation stattfindet, entsteht die endgültige Hornhaut. Dabei wird die Hornhaut unter dem hormonellen Einfluss von Thyroxin dehydriert (Coulombre und Coulombre, 1964). Außerdem wird zusätzlich über im Endothel befindliche Aquaporine Wasser aus dem Hornhautstroma geleitet (Thiagarajah und Verkman, 2002). Dadurch erlangt die *Cornea* ihre gewebetypische Transparenz und Dicke (Coulombre und Coulombre, 1958). Charakteristisch für das Stroma ist die lamellenförmige Struktur der Kollagenfibrillen (Zinn und Mockel-Pohl, 1975).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der humanen Hornhautentwicklung (modifiziert nach Pansky, 1982). A: 7. Woche. B: 3. Monat. Oberflächenektoderm (Oe), Mesenchym (M), Linse (L), corneales Epithel (CEp), Augenlid (Al), verwachsene Lidkante (VLk), vordere Augenkammer (VAK), corneales Endothel (CEn).

Das Oberflächenektoderm differenziert sich zum charakteristischen mehrschichtigen, nicht verhornten Hornhautepithel (*Epithelium anterius corneae*) (Walde et al., 2008). Durch mitotische Teilung der basalen Zellschicht (*Stratum basale*) entstehen die Flügelzellschicht (*Stratum intermedium*) und die Schuppenzellschicht (*Stratum superficiale*). Zeitgleich formen sich aus der *Epidermis* die Augenlider (*Palpebrae*), die sich schützend über die *Cornea* legen und zeitweise miteinander verwachsen. Bei Hund und Katze trennen sich die Augenlider erst postnatal nach etwa neun bis 14 Tagen, wohingegen Huftiere mit bereits geöffneten Augenlidern geboren werden (Zietschmann und Krölling, 1955; Dyce et al., 1991).

## 2.2 Makroskopische Anatomie

### 2.2.1 Morphologie des Auges

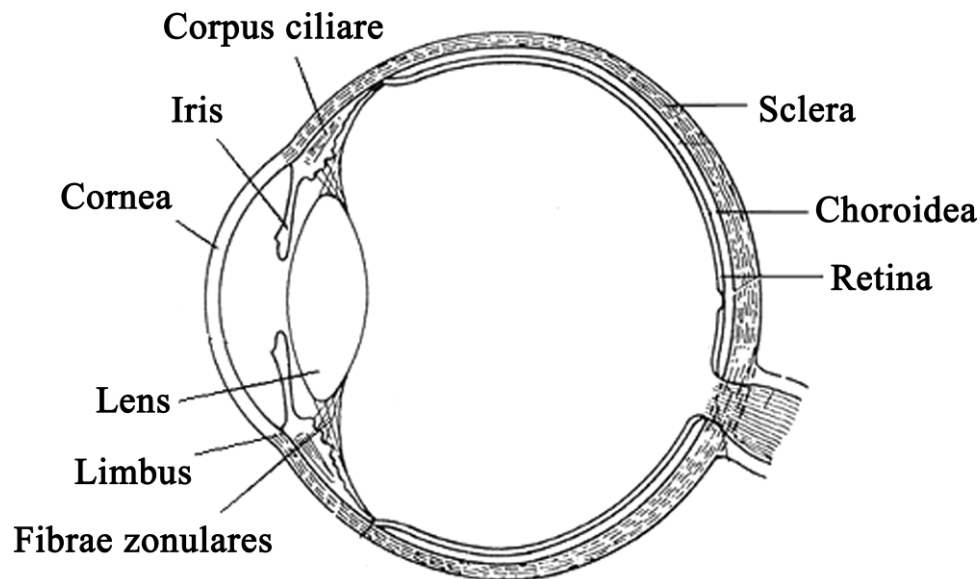
Wirbeltiere besitzen ein paarig angelegtes Linsenauge, welches aus dem Augapfel (*Bulbus oculi*), der den optischen Apparat bildet, und den Schutz- und Hilfseinrichtungen besteht (Michel, 1992). Die Augen treten im Vergleich zum Menschen bei den Haussäugetieren prominenter über die Gesichtsoberfläche hervor. Je nach Habitat und Art der Nahrungsaufnahme sind die Augen frontal bzw. lateral positioniert. So besitzen Fleischfresser wie Hund und Katze eine vorwärts gerichtete Augenstellung, die ein für das Jagen wichtiges binokulares Gesichtsfeld ermöglicht (Dyce et al., 1991). Pflanzenfresser hingegen benötigen als potentielle Beutetiere ein weites Gesichtsfeld. Durch die seitlich gerichteten Augen sind sie in der Lage frühzeitig Objekte in einem großen Radius wahrzunehmen, um auf eventuelle Gefahren reagieren zu können (Hanggi und Ingersoll, 2012).

In einer offenen Knochenhöhle (*Orbita*) gelegen, wird der Augapfel von einem weichen Fettpolster (*Corpus adiposum orbitae*) unterlagert und proximal kegelartig von einer derben Bindegewebsschicht (*Periorbita*) umgeben. Zwischen *Bulbus* und *Periorbita* liegen zusätzlich Augenmuskeln, Nerven, Gefäße und Drüsen (Nickel et al., 2004). Geschützt wird der vordere Teil des *Bulbus* durch die sich schließenden Augenlider (*Palpebrae superior et inferior*), die aus den Lidrändern (*Margo palpebrae*) eine Lidspalte (*Rima palpebrarum*) formen (Magrane, 1971a). Am vorderen Bereich der Lidränder befinden sich Wimpernhare (*Cilia*), welche sich am oberen Augenlid deutlicher darstellen. Der hintere Teil des *Bulbus* erfährt Schutz durch eine aus Schleimhaut bestehende Bindehaut (*Conjunctiva*) sowie durch den Tränenapparat (*Apparatus lacrimalis*) (Nickel et al. 2004).

Besagter Tränenapparat besteht aus einem ableitenden Tränenkanalsystem, welches sich, vereinfacht dargestellt, über die Tränenpunkte (*Puncta lacrimale*) im nasalen Augenwinkel in den Tränennasengang eröffnet. Hinzu kommen die sekretorischen Drüsen, die einen komplexen Tränenfilm produzieren. Die Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*) liegt innerhalb der *Orbita* superotemporal dem *Bulbus* auf und sezerniert ein wässriges Sekret (Walde et al., 2008). Allein beim Schwein handelt es sich um eine muköse Drüse (Liebich und König, 2005). Im basalen Abschnitt des dritten Augenlids (*Palpebra tertia*, Nickhaut), welches im nasalen Augenwinkel liegt, findet man die Nickhautdrüse (*Glandula palpebrae tertiae*

*superficialis*). Sie produziert tierartlich unterschiedlich ein mehr oder weniger seromuköses Sekret (Schlegel, 2000). Genauso wie die Nickhautdrüse zählt auch die Hardersche Drüse (*Glandula palpebrae tertiae profunda*) bei den meisten Tierarten zu den akzessorischen Tränendrüsen. Neben dem Tränenapparat tragen auch die Meibom-Drüsen (*Glandulae tarsales*) und die konjunktivalen Becherzellen zum Tränenfilm bei. Dabei produzieren die Meibom-Drüsen ein talgiges, die Becherzellen ein muköses Sekret (Zietzschmann und Krölling, 1955; Walde et al., 2008). Der komplexe Tränenfilm besteht somit aus einer äußeren Lipidschicht und einer mittleren wässrigen Lage, welche durch eine hydrophile, muköse Schicht vom Hornhautepithel abgegrenzt wird. Er hält den *Bulbus* feucht und säubert durch Wimpernschlag mit dem oberen Augenlid die *Cornea* (Davidson und Kuonen, 2004). Gleichzeitig dient die Tränenflüssigkeit der Brechung des in das Auge einfallenden Lichtes. Aufgrund der am stärksten differierenden Brechungsindizes findet die Hauptbrechung des Lichtes am Übergang vom Medium Luft zur Tränenflüssigkeit statt (Deeg et al., 2005).

Die Größe des *Bulbus* variiert von Tierart zu Tierart, wobei die Form meist nahezu kugelig ist. Bei Pferd lässt sich durch eine verkürzte anterior-posteriore Achse ein leichtes Abflachen des *Bulbus* erkennen. Die anterior-posteriore Achse verläuft vom Zentrum der Hornhaut (vorderer Pol) zum Zentrum der skleralen Krümmung (hinterer Pol). Eine äquatoriale Achse steht senkrecht zur ersteren und unterteilt den *Bulbus* in ein vorderes und hinteres Augensegment (Samuelson, 2013). Das Rind weist eine im Vergleich zum Hund deutlich längere anterior-posteriore Achse auf (Gaiddon et al., 1991; Potter et al., 2008). Sowohl bei Potter et al. (2008) als auch bei Gaiddon et al. (1991) lassen sich rassebedingte Größenunterschiede feststellen. Das Alter oder das Geschlecht innerhalb der Rasse stehen jedoch nicht im Zusammenhang mit der Bulbusgröße (Gaiddon et al., 1991).



**Abb. 2:** Schematischer Querschnitt eines Augapfels (modifiziert nach Hollwich, 1968).

Der Bau des Augapfels lässt sich in drei Wandschichten, die eine Hohlkugel bilden, unterteilen (Abb. 2). Die äußere Augenhaut wird im hinteren größeren Abschnitt aus der weißen, derb-elastischen *Sclera* und im vorderen Abschnitt aus der durchsichtigen *Cornea* gebildet (Romer, 1966). Am Übergang von Lederhaut zu Hornhaut verdickt sich erstere beim Fleischfresser zu einem Skleralwulst. Der Übergangsbereich wird auch als Limbus bezeichnet (Nickel et al., 2004). Die mittlere Augenhaut besteht proximal aus der gut durchbluteten und melaninreichen Aderhaut (*Choroidea*), welche sich auf Höhe des Übergangs der Lederhaut zur Hornhaut zu einem Ziliarkörper (*Corpus ciliare*) verdickt (Kolb, 1991). Im distalen Augenabschnitt schließt sich die Regenbogenhaut (*Iris*) an, die mit ihrer Begrenzung die verstellbare Pupille formt (Liebich und König, 2005). Dem Ziliarkörper haftet der Aufhängeapparat der Linse (*Lens*) in Form von Zonulafasern (*Fibrae zonulares*) an (Ammann und Pelloni, 1971). Die Linse fungiert durch ihre glasklare Substanz und bikonvexe Form als Sammellinse (Nickel et al., 2004). Durch die Transparenz der Hornhaut, des Kammerwassers (*Humor aquosus*), der Linse und des Glaskörpers (*Corpus vitreum*) kann Licht direkt ins Auge eindringen. Dabei wird das Licht mittels Refraktion maßgeblich an der Hornhaut gebrochen. Diese Verkleinerung ermöglicht es, dass sichtbare Eindrücke auf der Netzhaut (*Retina*) abgebildet werden (Dyce et al., 1991). Die Netzhaut stellt die innere Augenhaut dar. Sie ist mit ihrer zweiblättrigen Anlage, bestehend aus Pigmentepithel und Rezeptorschicht,

embryonal gesehen eine Modifikation der Vorderhirnwand und verkörpert den optisch reizbaren Teil des Auges (Sótonyi, 2010). In der vorderen Augenkammer (*Camera anterior bulbi*) zwischen Hornhaut und Irisvorderfläche sowie in der hinteren Augenkammer (*Camera posterior bulbi*) zwischen Irishinterfläche, Ziliarkörper und Linsenvorderfläche befindet sich das maßgeblich vom Ziliarkörper produzierte Kammerwasser. Der Glaskörper füllt den Hohlraum hinter der Linse aus (Koch und Berg, 1993). Durch den Bulbusinnendruck wird der gesamte Augapfel in Spannung gehalten, wodurch ihm seine arttypische Form verliehen wird (Ribeiro et al., 2010).

### 2.2.2 Gefäßversorgung

Die Hauptblutversorgung geschieht über die *Arteria (A.) maxillaris*, welche eine Fortführung der *A. carotis externa* darstellt. Aus ihr spaltet sich die *A. ophthalmica externa* ab, die ventral der *Orbita* in die *Periorbita* zieht (Magrane, 1971b, Liebich und König, 2005). Die Versorgung des Augapfels erfolgt, eingeteilt nach topographischen Gesichtspunkten, durch drei verschiedene Gefäßsysteme.

Das retinale Gefäßsystem wird von der *A. centralis retinae*, die der *A. ophthalmica* entspringt, gebildet und ernährt über tierartlich unterschiedlich abzweigende Äste die Netzhaut (Sótonyi, 2010). Beim Pferd ist die *A. centralis retinae* rudimentär entwickelt. Zur Netzhautversorgung spalten sich in diesem Fall Seitenäste von der *A. ophthalmica externa* ab, die an den *Nervus (N.) opticus* und den sogenannten blinden Fleck (*Discus nervi optici*) auf der Netzhaut ziehen (Liebich und König, 2005). Aus der *A. ophthalmica externa* gehen die *Arteriae (Aa.) ciliares posteriores breves* und *Aa. ciliares posteriores longae* ab und verteilen sich feinmaschig in der Aderhaut. Sie bilden das ziliare Gefäßsystem. Neben der Aderhaut werden dadurch auch der Ziliarkörper und die Regenbogenhaut mit Blut versorgt (Sótonyi, 2010). Aus den *Aa. ciliares posteriores breves et longae* bildet sich im Bereich der Irisbasis der *Circulus arteriosus iridis major*, der zusätzlich von den *Aa. ciliares anteriores* gespeist wird. Hierüber werden die Iris, der *Musculus (M.) ciliaris* und der Ziliarkörper vaskularisiert. Die *Aa. ciliares anteriores* versorgen des Weiteren den distalen Bereich der *Sclera* sowie die Randschlingen der *Cornea*. Letztere bleibt allerdings bis auf den feinen Randbereich avaskulär (Liebich und König, 2005). Neben der Diffusion aus den limbusnahen Kapillaren dienen das Kammerwasser und der Tränenfilm der Ernährung der Hornhaut (Dyce et al., 1991). Abschließend bilden sich aus der *A. maxillaris*, der *A. ophthalmica externa* und der *A. facialis*

die *Aa. conjunctivales anteriores*. Gemeinsam mit den *Aa. conjunctivales posteriores*, die sich aus den *Aa. ciliares anteriores* ableiten, bilden sie das konjunktivale Gefäßsystem und versorgen die Lederhaut und die Bindehaut (Sótonyi, 2010).

Der venöse Abfluss gestaltet sich analog zum arteriellen Zufluss. Hinzu kommt, dass die vier *Venae (Vv.) vorticosae* das Blut aus den *Vv. ciliares posteriores* sammeln und es den *Vv. ophthalmicae externae* zuführen. Die *Vv. ciliares anteriores* dienen zusätzlich noch dem Abfluss des Kammerwassers, welches über den *Plexus venosus sclerae* im Kammerwinkel (*Angulus iridocornealis*) in das Blutgefäßsystem einfließt (Liebich und König, 2005).

### 2.2.3 Nervenversorgung

Das Auge und seine Adnexe werden vom II. bis VII. Gehirnnerv innerviert. Die sensible Versorgung geschieht hauptsächlich über den *Nervus (N.) ophthalmicus* ( $V_1$ ), einem Ast des *N. trigeminus* (V) (Nickel et al., 2004). Zusammen mit dem *N. oculomotorius* (III), dem *N. trochlearis* (IV), dem *N. maxillaris* ( $V_2$ ) und dem *N. abducens* (VI) tritt er über das *Foramen rotundum* bzw. das *Foramen orbitorotundum* in die *Orbita* ein. Dort verzweigt er sich u.a. in den *N. nasolacrimalis*, welcher sensible Fasern in Form von *Nn. ciliares longi et breves* an den Augapfel abgibt (König et al., 2005). Diese Fasern treten am hinteren Augenpol radiär um den *N. opticus* (II) in die Sklera ein und versorgen die äußere und mittlere Augenhaut. Im Bereich des Limbus bilden sie ein ringförmiges Netzwerk, den sogenannten perikornealen Nervenplexus. Aus diesem Plexus ziehen einzelne Nervenfaserbündel in das Stroma der Hornhaut (Belmonte et al., 2011). Diese verzweigen sich in feine Äste und verbinden sich teilweise mittig des Stromas. Der größte Teil jedoch verläuft horizontal im Stroma und penetriert zentral der Hornhaut das Epithel (He et al., 2010). Die anfänglich myelinisierten Nervenfasern verlieren kurz nach Eindringen in das Hornhautstroma ihre Myelinscheide (Gum et al., 2013). Dies ist notwendig, um die Transparenz der Hornhaut zu gewährleisten (Müller et al., 2003). Neben dem perikornealen Nervenplexus entspringt den *Nn. ciliares* auch ein subepithelialer Nervenplexus, der bereits peripher in das Hornhautepithel eindringt und dieses innerviert (Chan-Ling, 1989). Das Hornhautepithel ist bis zu dreihundert bis sechshundertfach dichter mit Nervenfasern versorgt als die Haut, wobei die Dichte vom Zentrum zur Peripherie hin abnimmt (Rózsa und Beuerman, 1982). Bei Berührung der Hornhaut wird der Kornealreflex ausgelöst, wodurch der *Musculus (M.) orbicularis oculi* die

Augenlider schließt und somit das Auge vor Schädigung schützt (Hiraoka und Shimamura, 1977).

## **2.3 Anatomie der Hornhaut**

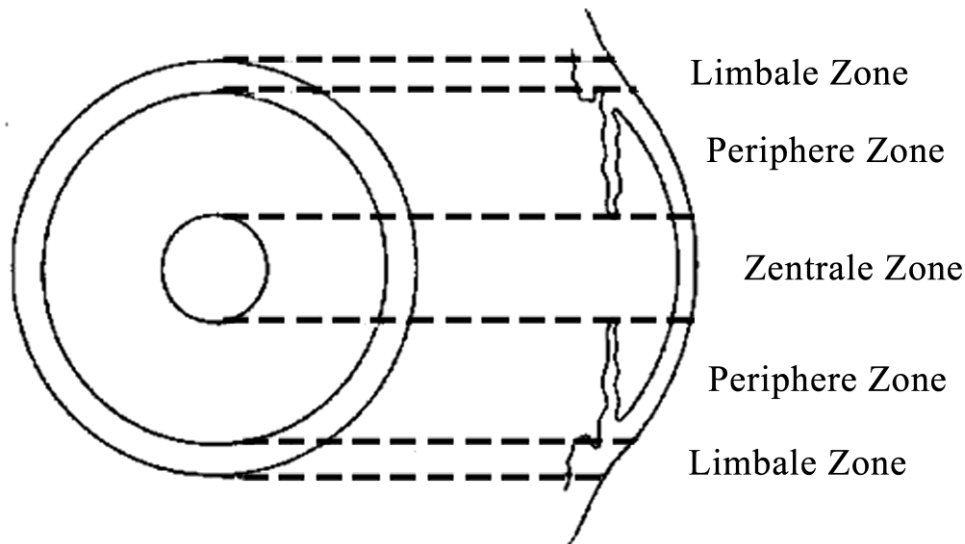
### **2.3.1 Makroskopie**

Die Hornhaut bildet gemeinsam mit der Lederhaut die äußere Augenhaut (Romer, 1966). Die Hauptfunktionen dieser äußeren Schicht stellen die Stabilisierung des Augapfels sowie der Schutz vor äußeren Einflüssen dar. Darüber hinaus ermöglicht die Hornhaut durch ihre Transparenz den Eintritt von Licht in das Augeninnere und übernimmt den größten Anteil der Lichtbrechung (Meek und Fullwood, 2001). Ungefähr ein Fünftel der Oberfläche des Augapfels stellt die Hornhaut dar (Walde et al., 2008). Sie besitzt eine mehr oder weniger horizontal-elliptische Form. Dies ist besonders bei den Huftieren der Fall, wodurch das horizontale Blickfeld im Vergleich zu den Fleischfressern, die eine annähernd runde Hornhaut aufweisen, deutlich erweitert wird (Samuelson, 2013). Beim Hund beträgt der horizontale Durchmesser 13 bis 17 mm, bei der Katze ca. 16,5 mm (Walde et al., 2008).

Bei der Dickenmessung der Hornhaut (*Pachymetrie*) misst die Hornhaut von Hund und Katze zentral ca. 0,8 bis 1 mm; peripher reduziert sich ihre Dicke auf 0,4 bis 0,6 mm (Gilger et al., 1993). Die dickste Hornhaut unter den Haussäugetieren wurde beim Rind gemessen (zentral 1,5-2,0 mm und peripher 1,5-1,8 mm). Das Pferd hat eine Hornhautdicke von zentral 1,0-1,5 mm und peripher 0,8 mm (Samuelson, 2013). Im Gegensatz dazu gibt Drenckhahn (2004) an, dass die Dicke beim Menschen vom Zentrum (0,52 mm) zur Peripherie (0,67 mm) hin zunimmt.

Die Hornhaut ist wie ein Uhrglas in die Lederhaut eingelassen. Dabei läuft der äußere Skleralrand ca. 1 mm über die Hornhaut hinaus (Schmidt, 1988). Der Übergang des transparenten Hornhautepithels zur opaken Lederhaut markiert den Limbus. Von außen betrachtet liegt dieser zwischen Hornhaut- und Konjunktivalepithel. Im Augeninneren lässt sich seine Grenze zwischen dem Hornhautendothel und dem trabekulären Netzwerk ziehen (Van Buskirk, 1989). Hier kann das Hornhautepithel eine Pigmentierung aufweisen (Samuelson, 2013). Da sowohl die Hornhaut als auch die Lederhaut größtenteils aus kollagenen Fasern bestehen, ist eine genaue histologische Abgrenzung des Limbus ohne

Pigmentierung schwer möglich (Van Buskirk, 1989). Durch einen zur Lederhaut reduzierten Biegungsradius wirkt die Hornhaut aus dem Augapfel hervorgewölbt und bildet den vorderen Augenpol, der zentral als *Vertex cornea* bezeichnet wird (Sótonyi, 2010).



**Abb. 3:** Schematische Einteilung der Hornhaut nach topographischen Aspekten, modifiziert nach Kraff und Robin (1989).

Topographisch lässt sich die Hornhaut in drei Zonen einteilen, wobei die Grenzen fließend sind (Abb. 3). Die zentrale Zone befindet sich mittig der Hornhaut. Ihr folgt anschließend die periphere Zone, die sich bis zur inneren Limbusgrenze erstreckt. Als weiteres Merkmal wird die Hornhaut in dieser Zone allmählich flacher. Den Übergang von der Hornhaut auf die Lederhaut markiert die limbale Zone (Clark, 1974).

### 2.3.2 Mikroskopie

Die Hornhaut lässt sich histologisch in fünf Schichten einteilen. Oberflächlich gelegen befindet sich das vordere Hornhautepithel (*Epithelium anterius corneae*), dem eine vordere Grenzmembran (Bowmansche Membran, *Lamina limitans anterior*) unterlagert sein kann. Mittig findet man die Eigenschicht der Hornhaut (Stroma, *Substantia propria*). Eine hintere Grenzmembran (Descemetsche Membran, *Lamina limitans posterior*) trennt das Stroma vom hinteren Hornhautepithel (*Epithelium posterius corneae*), das auch als Endothel bezeichnet



wird (Grau, 1960; Michel, 1992; Liebich, 2010). Im Folgenden soll der Aufbau der einzelnen Schichten genauer beleuchtet werden.

### **Vorderes Hornhautepithel (Epithel)**

Das Hornhautepithel besteht allgemein aus einem nichtverhornten Plattenepithel, welches sehr regulär angeordnet ist (Kenyon, 1979). Bei den Fleischfressern weist das Epithel eine Schichtdicke von ungefähr 25- 40 µm auf. Huftiere besitzen ein bis zu viermal dickeres Hornhautepithel. Dabei ist das Epithel jeweils in der Peripherie dicker als im Zentrum (Samuelson, 2013). Michel (1992) beschreibt das Epithel tierartenübergreifend mit fünf bis zwölf Zelllagen. Danach besitzt das Schwein zehn bis zwölf, der Hund hingegen nur acht bis zehn Zellreihen (Michel, 1992). Zur genaueren Betrachtung lässt sich das Epithel in drei weitere Schichten unterteilen.

Die basale Schicht (*Stratum basale*) zeichnet sich durch eine einschichtige säulenförmige Zellreihe aus (Shively und Epling, 1970), die hauptsächlich Mitosestadien aufweist und eine Basalmembran produziert (Kenyon, 1979), mit der sie über Hemidesmosome verankert ist (Buck, 1983). Die Basalmembran setzt sich aus Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat und Fibronektin zusammen. Wie alle Basalmembranen dient auch diese als Grundlage der epithelialen Zellmigration (Dawson et al., 2011). Durch die dichte Aufreihung der Basalzellen kommen die Zellkerne, welche sich apikal befinden, häufig in verschiedenen Ebenen zum Liegen (Samuelson, 2013).

Die mittlere Schicht (*Stratum intermedium*) sitzt dem *Stratum basale* auf und besteht aus sogenannten Flügelzellen von polygonaler Form. Sie stellt eine Transitzone dar (Pedler, 1962). Die Anzahl der Zelllagen variiert abhängig von Tierart und Lokalisation auf der Hornhaut zwischen zwei oder drei Schichten bei den Fleischfressern bis hin zu mehreren Schichten bei den Wiederkäuern (Samuelson, 2013). Dabei sind die Zellen nach außen hin konvex geformt (Drenckhahn, 2004).

Die Zellen der obersten Schicht (*Stratum superficiale*) werden lang und gleichzeitig sehr flach. Über eine gute Zell-Zell-Verbindung durch *Zonulae occludentes* oder tight junctions entsteht eine ausgeprägte Permeabilitätsschranke (Kenyon, 1979). Die Superfizialzellen weisen den höchsten Grad an Differenzierung auf und werden beim Menschen und der Ratte ca. alle sieben Tage durch Abstreifen (Desquamation) in den Tränenfilm erneuert (Hanna et al., 1961; Michel, 1992). Bei der Desquamation der schuppenartigen Epithelzellen bleiben

anfänglich kraterförmige Defekte in der Hornhautoberfläche zurück (Haberich und Lingelbach, 1982). Zur Epithelerneuerung stehen Stammzellen bereit, die sich beim Menschen im Bereich des korneoskleralen Limbus befinden. Der Limbus dient auch als eine Art Barriere, damit keine konjunktivalen Zellen in die Hornhautoberfläche einwandern können (Dua und Azuara-Blanco, 2000).

Die Oberfläche der Hornhaut stellt sich im Rasterelektronenmikroskop flach dar und weist zentral kurze Oberflächenausstülpungen wie Mikrozotten (*Microvilli*) auf. Vereinzelt lassen sich breitere Leisten, die Mikrofaltten (*Microplicae*) erkennen (Nichols et al., 1983). *Microvilli* werden von Collin und Collin (2000) als fingerähnliche Fortsätze und *Microplicae* als kurze Faltten ( $<1\text{ }\mu\text{m}$ ) beschrieben. Zusätzlich bezeichnen sie lange Faltten als *Microridges* ( $>1\text{ }\mu\text{m}$ ) (Collin und Collin, 2000). Zellen mit vielen Mikroprojektionen stellen sich im Rasterelektronenmikroskop heller dar als die dünnbesiedelten dunklen Zellen. Dies korreliert mit dem Zellalter. So weisen ältere Zellen kurz vor ihrer Abschilferung deutlich weniger Mikroprojektionen auf und können den Tränenfilm nicht mehr adäquat stabilisieren (Kenyon, 1979). Zusätzlich steigern *Microvilli* und *Microplicae* über die vergrößerte Zelloberfläche die Aufnahme und Abgabe über das Epithel (Collin und Collin, 2000).

### **Vordere Grenzmembran (Bowmansche Membran)**

Die Bowmansche Membran ist die verdichtete äußerste Schicht des Stromas (Oda und Fukuda, 1962). Über die Existenz der Bowmanschen Membran bei den Haussäugetieren herrscht Uneinigkeit. Nach Hayashi et al. (2002) ist sie bei höheren Säugetieren deutlicher ausgeprägt, wohingegen Michel (1992) sie nur für Primaten postuliert. Unter dem Rasterelektronenmikroskop formt die Bowmansche Membran bei der Katze vogelnestähnliche Kuhlen. Beim Rind wurde eine  $5\text{ }\mu\text{m}$  dicke Bowmansche Membran ermittelt (Hayashi et al., 2002). Beim Hund konnte sie hingegen nicht wahrgenommen werden (Oda und Fukuda, 1962). Sie ist nicht von elastischer Natur, aber ziemlich strapazierfähig. Daher soll die Bowmansche Membran der Hornhaut zusätzliche Steifigkeit verleihen (Samuelson, 2013).

### **Eigenschicht der Hornhaut (Stroma)**

Das Stroma ist ein kollagenreiches Bindegewebe, das ca. 90% des Gesamtvolumens der Hornhaut ausmacht (Poole et al., 1993). Beim Rind weist es eine Schichtdicke von  $800\text{ }\mu\text{m}$  auf (Hayashi et al., 2002). Zusammengesetzt ist das Stroma aus einer extrazellulären Matrix

und einzeln verteilten Keratozyten (Maurice, 1957). Bei den Keratozyten handelt es sich um modifizierte Fibroblasten, die die Hauptzellen des Stromas bilden. Sie stellen dünne Zellen dar und besitzen zahlreiche sich abplattende Fortsätze (Poole et al., 1993). Keratozyten weisen unter dem Transmissions-elektronenmikroskop eine Fülle von Zellorganellen auf, die auf eine hohe Zellaktivität schließen lassen. Sie sind für den Umsatz der extrazellulären Matrix verantwortlich und dienen somit der Integrität des Stromas. Unterhalb des Epithels sind die Keratozyten nicht parallel zur Hornhautoberfläche ausgerichtet. Im hinteren Bereich des Stromas erscheinen sie hingegen deutlich geordneter (Müller et al., 1995). Die Zelldichte der Keratozyten nimmt vom vorderen Stromabereich zum hintern Abschnitt hin stetig ab (Hahnel et al., 2000; Kafarnik et al., 2007). Die Keratozyten sind meist sternförmig und besitzen vier bis fünf Zellfortsätze. Vereinzelt lassen sie sich auch in bipolarer Form mit langen, dünnen Fortsätzen finden (Kang und Ko, 2005). Zusätzlich können sich die Zellfortsätze verzweigen (Hahnel et al., 2000). Über die Zellfortsätze stehen benachbarte Keratozyten in Kontakt, wodurch ein funktionelles Netzwerk gebildet wird (Kang und Ko, 2005). Außerdem lassen sich im Stroma vereinzelt sogenannte Wanderzellen finden, bei denen es sich meist um Leukozyten handelt (Samuelson, 2013). Die extrazelluläre Matrix zeichnet sich durch ihre Anordnung dichtgepackter, parallelgerichteter Kollagenfibrillen aus, die in einem hydratisierten Gerüst aus Glykoproteinen und Proteoglykanen eingebettet sind (Maurice, 1957). Hauptsächlich sind Kollagene vom Typ I, III, V, VI und XII am Aufbau beteiligt (Samuelson, 2013). Das Gerüst, an dem sich Wasser anlagert, wird unter anderem von Keratansulfat, Dermatansulfat und Chondroitin-4-sulfat gebildet (Castoro et al., 1988). Dadurch ergibt sich im Stroma ein Wassergehalt von 78 % (Bettelheim und Plessy, 1975). Die bündelförmigen Kollagenfibrillen weisen eine dreidimensionale Organisation auf und sind untereinander deutlich vernetzt. Sie bilden bandartige Lamellen, die sich aufspalten (Radner et al., 1998) und von Limbus zu Limbus verlaufen (Polack, 1961). Dabei tauschen benachbarte Schichten der Hornhaut Fasern miteinander aus. Die Lamellen setzen sich in der Lederhaut fort (Polack, 1961). Im hinteren Bereich des kornealen Stromas sind sie regulärer angeordnet als im vorderen Drittel (Müller et al., 2001). Innerhalb der Lamellen liegen die Kollagenfibrillen jedoch immer parallel angeordnet (Radner et al., 1998). Durch die spezielle Anordnung der Kollagenfibrillen und die Zusammensetzung des Stromas wird die Transparenz der Hornhaut gewährleistet (Dawson et al., 2011).

### **Hintere Grenzmembran (Descemetsche Membran)**

Die Descemetsche Membran ist eine Basalmembran, die von den Endothelzellen der Hornhaut produziert wird (Labermeier und Kenney, 1983). Sie lässt sich klassisch wie alle Basalmembranen durch die PAS-Reaktion (periodic acid-schiff) anfärben (Day, 1950). Die Descemetsche Membran bildet eine feine Struktur von großer Regelmäßigkeit, woraus sich eine deutlich höhere Widerstandsfähigkeit im Vergleich zum Stroma ableiten lässt (Jakus, 1956). Sie verkörpert somit eine zusätzliche Schutzgrenze innerhalb der Hornhaut (Samuelson, 2013). Die Ultrastruktur lässt drei Zonen erkennen. So grenzt an das Stroma eine dünne ungestreifte Zone, der eine breitgestreifte Zone folgt. Zum Endothel hin liegt abschließend eine breite ungestreifte Zone (Samuelson, 2013). Verdichtete Knötchen, die über spangenähnliche Strukturen verbunden sind, lassen im Elektronenmikroskop ein hexagonales Gitter erkennen. Zusätzlich verlaufen parallel zur Hornhautoberfläche sehr feine Filamente im Gitterzwischenraum (Sawada, 1982). Neben Kollagen Typ III bis VI ist besonders Kollagen Typ VIII an der hexagonalen Gitterstruktur, insbesondere in der mittleren breitgestreiften Zone, beteiligt (Kapoor et al., 1988; Samuelson, 2013). Mit zunehmendem Alter wird die Descemetsche Membran immer dicker (Johnson et al., 1982). Dies erklärt die unterschiedlichen Schichtdicken der Descemetschen Membran innerhalb einer Tierart. Beim Rind wurden Schichtdicken von 20 µm (juvenil) (Hayashi et al., 2002) bis 70 µm (adult) (Sawada, 1982) gemessen.

### **Hinteres Hornhautepithel (Endothel)**

Das Hornhautendothel ist durch ein einschichtiges Plattenepithel charakterisiert (Drenckhahn, 2004). Es besteht aus Zellen mit einem weit vergrößerten Zellkern (Shively und Epling, 1970). Die Endothelzellen sind metabolisch sehr aktiv, was die große Anzahl an Zellorganellen wie Mitochondrien, rauem und glattem endoplasmatischen Retikulum und Vesikeln erklärt (Samuelson, 2013). Die Zellgrenzen greifen ineinander über (Shively und Epling, 1970) und stellen sich als gezackte Linien dar (Blümcke und Morgenroth, 1967). Lichtmikroskopisch zeigt sich das Endothel als eine einschichtige Lage isoprismatischer Zellen (Rodrigues et al., 2006). Unter dem Rasterelektronenmikroskop bilden die polygonalen, meist hexagonalen Zellen eine mosaikähnliche Struktur (Sherrard und Ng, 1990). Beim Hund vergrößern sich die Endothelzellen, wobei die Zelldichte gleichzeitig von 2500 Zellen/mm<sup>2</sup> (juvenil) auf < 2100 Zellen/mm<sup>2</sup> (adult) abnimmt (Gwin et al., 1982). Mit

zunehmenden Alter sinkt somit die Dichte der kornealen Endothelzellen (Kaji et al., 2001). Im Vergleich zum Hund besitzt das Schaf sehr kleine Endothelzellen, dafür jedoch mit ca. 11000 Zellen/mm<sup>2</sup> eine höhere Zelldichte (Collin und Collin, 1998). Zwischen Peripherie und Zentrum lassen sich in Bezug auf die Zelldichte keine Unterschiede erkennen (Rodrigues et al., 2006). Auf der apikalen Zelloberfläche ragen einzeln sehr feine, kleine mikrovilliähnliche Ausstülpungen in die vordere Augenkammer hinein (Doughty, 1998). Zusätzlich trägt nahezu jede Endothelzelle eine Primärzilie (Gallagher, 1980).

Im Laufe des Alters verändert das Endothel seine Form (Laing et al., 1976). Zunächst sind die Endothelzellen bei der Katze postnatal pleomorph, später bildet sich im Erwachsenenstadium eine hexagonale Anordnung (MacCallum et al., 1983). Im hohen Alter werden die Zellen größer und wieder zunehmend pleomorpher (Laing et al., 1976). Da sich die Endothelzellen nur in geringem Maße teilen, wird der Erhalt einer funktionellen Endothelzellschicht primär durch Zellhypertrophie und Zellmigration gesichert (Gwin et al., 1982; MacCallum et al., 1983). Dies ermöglicht die endotheliale Barriere- und Ionenpumpfunktion des Endothels aufrechtzuerhalten, wodurch die korneale Transparenz gewährleistet wird (Joyce, 2012).

## **2.4 Physiologie der Hornhaut**

Die Hornhaut ist das stärkste Brechmedium im Auge (Holly und Lemp, 1977). An der Grenzfläche zwischen Hornhaut und Luft wird der stärkste Diopfer im optischen System des Auges gebildet (Rolando und Zierhut, 2001). Dabei entsteht die Brechkraft hauptsächlich am Übergang von Luft zum Tränenfilm auf der Hornhaut (Holly und Lemp, 1977). Durch die äußerste Lipidschicht des Tränenfilms wirkt die Oberfläche der Hornhaut glatt und glänzend und bildet zur Luft hin eine für die Lichtbrechung entscheidende, optisch wirksame Grenze (Eule, 2007). Die Hornhaut ist somit für bis zu 70 % der Brechkraft des Auges verantwortlich und lässt dazu mehr als 90 % des einfallenden Lichtes in das Auge eintreten (Hatami-Marbini und Etebu, 2013). Das kurzwellige Licht wird vom Hornhautepithel absorbiert, wohingegen Lichtstrahlen des sichtbaren Spektrums weitergeleitet werden (Jester et al., 1999). Eine exakte Krümmung der Hornhaut sowie ihre, für die Refraktion entscheidende, hoch geordnete Mikrostruktur, sind für eine scharfe Abbildung im Auge von größter Bedeutung (Hatami-Marbini und Etebu, 2013). Durch die Krümmung der Hornhaut wird das Licht wie in einer

konvexen Linse gebündelt und erzeugt auf der Netzhaut eine Abbildung (Deeg et al., 2005; Ofri, 2013). Gleichzeitig reduziert die spezielle Anordnung der Fibrillen die Lichtstreuung und ermöglicht somit die Transparenz der Hornhaut (Hassell und Birk, 2010). In großen Augen, die typischerweise eine flache Hornhaut besitzen, ist die Brechkraft reduziert. So weist das Pferd eine im Vergleich zur Katze nur halb so große Brechkraft auf (Ofri, 2013).

Der Tränenfilm, das Epithel der Hornhaut und der Konjunktiva, die Tränendrüsen sowie die Augenlider bilden eine funktionale Einheit, um das Auge vor äußeren Einflüssen zu schützen (Rolando und Zierhut, 2001). Des Weiteren dienen das Kammerwasser und der physiologische intraokulare Druck der Unversehrtheit der Hornhaut (Gum et al., 2013). Die muköse Tränenschicht, die überwiegend aus den konjunktivalen Becherzellen sezerniert wird, wirkt auf dem Hornhautepithel als Netzmittel, sodass die wässrige Tränenlage die Hornhaut komplett benetzen kann (Haberich und Lingelbach, 1982). Die Morphologie des Hornhautepithels trägt zur Stabilisierung des Tränenfilms bei. So bleibt die muköse Tränenschicht an den Epithelausstülpungen, wie z.B. *Microvilli* und *Microplicae*, besonders gut haften (Pfister, 1973). Über die wässrige Tränenlage wird der avaskulären Hornhautoberfläche Sauerstoff, Glukose und weitere essentielle Nährstoffe zugefügt (Rolando und Zierhut, 2001). Zusätzlich erhält die Hornhaut vom Kammerwasser und den Kapillaren im Bereich des Limbus ihre Nährstoffe. Für die Aufrechterhaltung der relativen Dehydratation der Hornhaut wird Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Über das Kammerwasser wird Glukose zur ATP-Gewinnung bereitgestellt. Daneben steht weitere Glukose aus der Tränenflüssigkeit und den limbalen Kapillaren zur Verfügung. Im Hornhautepithel wird Glukose in Form von Glykogen gespeichert und unter Stressbedingungen freigesetzt. Jedoch hat das Endothel im Vergleich zum Epithel einen ca. fünfmal höheren Glukosebedarf, um seine Funktion aufrecht zu erhalten (Gum et al., 2013). Das Epithel erhält Sauerstoff über die Tränenflüssigkeit, das Endothel und die Keratozyten hingegen aus dem Kammerwasser (Gum et al., 2013). Es befinden sich in der Tränenflüssigkeit zusätzlich verschiedene Wachstumsfaktoren, die das Hornhautepithel zur Proliferation, Migration und Differenzierung anregen. Somit ist ein intakter Tränenfilm entscheidend für die Integrität des Hornhautepithels (Tripathi et al., 1990; Klenkler et al., 2007). Gleichzeitig transportiert der Tränenfilm abgeschilferte Epithelzellen und Fremdkörper von der Hornhautoberfläche ab (Rolando und Zierhut, 2001).

Um die Transparenz der Hornhaut zu gewährleisten, bedarf es einer genauen Regulierung des Wassergehaltes des Stromas (Verkman, 2003). Das Hornhautstroma hat, ähnlich wie Gelatine, eine starke Tendenz Wasser aufzunehmen und zu quellen (Hart, 1947). Durch die geringe relative Hyperosmolarität des Stromas zum Kammerwasser bindet das Stroma über die Glykosaminoglykane der Matrix Wasser, wodurch sich ein stromaler Sättigungsdruck einstellt (Tuft und Coster, 1990). Dennoch befindet sich die Hornhaut insgesamt in einem relativen Dehydrationszustand, der über Ionenpumpen erhalten werden muss (Walde et al., 2008). Sowohl im Hornhautepithel als auch im Hornhautendothel befinden sich viele Ionentransporter, die über einen osmotischen Gradienten einen Wassertransport ermöglichen (Tuft und Coster, 1990). Durch den daraus entstehenden passiven Wasseraustausch wird der Wassergehalt bei ungefähr 80 % gehalten (Walde et al., 2008). Dabei stehen der Hornhaut zusätzlich Wasserkanäle (Aquaporine) zum transzellulären Transport zur Verfügung. Im Endothel läuft allerdings der größere Teil des Flüssigkeitsstroms parazellulär ab (Diecke et al., 2011; Fischbarg, 2012). Ferner lassen sich im Epithel und Endothel  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen finden, die die Kationenkonzentration in der Hornhaut regeln (Gum et al., 2013). Außerdem unterstützt das Epithel durch einen ergänzenden Flüssigkeitsausstrom das Endothel in der Regulation der stromalen Hydratation und liefert somit einen Beitrag zur Erhaltung der Hornhauttransparenz (Klyce und Crosson, 1985).

Aufgrund der kornealen Transparenz ist eine entzündliche Reaktion der Hornhaut unerwünscht, um ihre präzise Struktur nicht zu verändern (Rolando und Zierhut, 2001). Die Hornhaut ist jedoch permanent schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Neben Fremdkörpern muss die Hornhaut die innenliegenden Augenstrukturen vor einer Reihe von Mikroorganismen schützen. Hierfür macht sich die Hornhaut eine Kombination aus mechanischen, anatomischen und immunologischen Schutzmechanismen zu eigen (Akpek und Gottsch, 2003). Das Hornhautepithel muss insbesondere als physikalische Schutzbarriere dienen, da die Hornhaut im direkten Kontakt zur Außenwelt steht. Durch tight junctions im *Stratum superficiale* ist das Hornhautepithel nicht permeabel (Klyce und Crosson, 1985; Wang et al., 1993). Gemeinsam mit dem Tränenfilm werden durch den Lidschlag Antigene von der Augenoberfläche gewischt (Argüeso und Gipson, 2001; Knop und Knop, 2007); außerdem perlen zusätzlich hydrophile Partikel an der äußeren Lipidschicht des Tränenfilms ab (Brauninger et al., 1972). Im Vergleich zum Konjunktivalepithel reagiert das Hornhautepithel kaum immunologisch (Rolando und Zierhut, 2001). Unter physiologischen Umständen finden sich keine lymphatischen Zellen in der Hornhaut (Cursiefen et al., 2002).

Tränenfilmproteine wie Lysozym, Albumin und Laktoferrin erzeugen allerdings eine antibakterielle Wirkung (Eule, 2007). Zusätzlich stehen in der Tränenflüssigkeit Antikörper, insbesondere Immunglobulin A (IgA) für die Immunabwehr zur Verfügung. Das IgA stammt aus Plasmazellen der Konjunktiva und der Nickhautdrüse sowie aus Lymphozyten (Schlegel et al. 2003; Eule, 2007).

## 2.5 Cytokeratine

Das Zytoskelett der *Eukaryonten*, das das Zellverhalten und die Zellfunktion mitbestimmt, besteht überwiegend aus drei Bestandteilen, den Intermediärfilamenten (IF), Aktinfilamenten und Mikrotubuli. Die IF sind dynamische, bewegliche Einheiten, die für den Transport von kurzen Filamenten innerhalb der Zelle verantwortlich sind (Helfand et al., 2004). Sie lassen sich in neun Typen unterteilen. So zählt man neben den Cytokeratinen (Epithelien) auch die Neurofilamente (Nervenzellen), die sauren Gliafaserproteine (Gliazellen), Peripherin (Nervenzellen),  $\alpha$ -Internexin (Axone), Vimentin (Mesenchymzellen), Desmin (Muskelzellen), Nestin (neuronale Stammzellen) und die Lamine (ubiquitär in Zellkernen) zu den IF (Nagle, 1994). Die Cytokeratine (CK) sind auch unter dem Namen Keratine bekannt (Frank et al., 1978). Intrazellulär bilden die CK ein Netzwerk aus, das der Zellstabilisierung dient (Sundström und Stigbrand, 1994). Ca. 30 % der zellulären Proteine in einem mehrschichtigen Plattenepithel sind CK. Sie umfassen eine hochkomplexe Familie von Polypeptiden (Lazarides, 1982). Die mehr als 50 verschiedenen CK lassen sich in zwei unterschiedliche Sequenztypen einteilen (Coulombe et al., 2004). Typ I-Cytokeratin (CK9 - CK23; Ha1 - Ha8) gehört der sauren Subfamilie, Typ II-Cytokeratin (CK1 - CK8; Hb1 - Hb6) der basischen Subfamilie an (Hatzfeld und Franke, 1985; Coulombe und Omary, 2002). Es fügt sich jeweils eine Einheit eines Typ I-Cytokeratins mit einer Einheit eines Typ II-Cytokeratins zu einem Heteropolymer zusammen (Coulombe et al., 2004). Aus zwei Heteropolymeren bildet sich daraufhin ein Tetramer, das den Grundbaustein des endgültigen Filaments darstellt (Karp, 2005). Die CK sind spezifisch für Epithelien und bilden die größte und variationsreichste Gruppe der IF (Sawaf et al., 1992). Sie besitzen eine molekulare Masse von 40-66 kDa und sind schwer wasserlöslich (Tseng et al., 1982; Moll et al., 2008). Alle CK besitzen drei gemeinsame Strukturmerkmale. Zentral findet man eine stabförmige  $\alpha$ -Helix, die jeweils von vier nichthelikalen Segmenten unterbrochen wird. Der Kopfabschnitt (head) ist stets ein



aminoterminalen Ende, der Schwanzabschnitt (tail) weist hingegen immer eine Carboxy-Domäne auf (Nagle, 1994). Die IF liefern ein flexibles intrazelluläres Gerüst, das das Zytoplasma strukturiert und externen Stressoren widersteht und somit die Zelle stabilisiert (Sundström und Stigbrand, 1994; Fuchs und Cleveland, 1998). Die Hauptfunktion der CK besteht darin die Zelle vor mechanischem und nichtmechanischem Stress zu schützen. Außerdem spielen sie eine Rolle in der Signalweiterleitung und der Apoptose (Coulombe und Omary, 2002; Magin et al., 2007).

Mit Hilfe von Antikörpern konnten CK in den unterschiedlichsten Epithelgeweben wie z.B. in Plattenepithelzellen der Haut sowie in Myoepithelzellen der Milchdrüse identifiziert werden (Altmannsberger et al., 1981). Auch in okularem Gewebe wie im Hornhautepithel wurden bereits CK3 und 12 sowie CK5 und 19 gefunden. Das CK19 kommt in erster Linie basal im Limbus der Hornhaut vor (Kasper et al., 1988). Im Gegensatz dazu zeigt CK3 im zentralen Hornhautepithel eine höhere Expression als im Limbus (Pauklin et al., 2011). Das CK3 ist zudem mit CK2 verwandt, das wiederum den CK1 und 5 in seiner Sequenz nahesteht. Dabei wird CK2 streng suprabasal exprimiert und lässt sich für gewöhnlich ab der dritten Zelllage der *Epidermis* finden (Collin et al., 1992a).

## 2.6 p63

Der Transkriptionsfaktor p63, auch unter den Namen p40, p51, p73L oder KET (keratinocyte transcription factor) bekannt, ist homolog zu p53 und wird gemeinsam mit diesem und p73 einer Genfamilie zugeordnet (Kaelin, 1999; Salehi-Had et al., 2005). Dabei kann das Protein p63 als Vorläufer von p53 und p73 angesehen werden (Yang et al., 1998). Ihnen allen ist die Fähigkeit gegeben DNS (Desoxyribonukleinsäure) zu binden, die Transkription zu starten und die Apoptose einzuleiten (Kaelin, 1999). Das Gen für p63 produziert eine Gruppe von Transkripten mit voller Länge (TAp63) und eine Gruppe mit amino-terminal verkürzten Enden ( $\Delta$ Np63) (Little und Jochemsen, 2002). Insgesamt besitzt das Protein p63 fünfzehn Exons, die auf 220 kbp verteilt liegen (Barbieri und Pietenpol, 2006). Durch alternatives Spleißen werden die Carboxy-Enden so verändert, dass in beiden Gruppen jeweils eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoform entsteht (Di Iorio et al., 2005).

Das Protein p63 ist essentiell für die Vorläuferzellen der Epithelentwicklung und der Morphogenese komplexer Körperteile wie z.B. der Gliedmaßen und des Gesichtsbereichs (Yang et al., 1999). Es ist auf hochproliferatives Gewebe begrenzt und wird in sich ausdifferenzierenden Zellen nicht mehr exprimiert (Parsa et al., 1999). In humanen und murinen Geweben, insbesondere in proliferativen Basalzellen verschiedener Epithelien, wurde das Protein p63 bereits nachgewiesen (Yang et al., 1998). Mittels eines monoklonalen Antikörpers können in der Immunhistochemie alle Isoformen von p63 detektiert werden (Di Iorio et al., 2005). Der Nachweis von p63 lässt auf ein Stammzellpotential der Zelle schließen (Pellegrini et al., 2001). So ist der Transkriptionsfaktor in der humanen Hornhaut in den epithelialen Basalzellen des Limbus lokalisiert, wohingegen er suprabasal des Epithels bzw. zentral der Hornhaut nahezu nicht nachzuweisen ist (Pellegrini et al., 2001; Chen et al., 2004; Wang et al., 2005). Die kornealen Stammzellen enthalten die  $\alpha$ -Isoform, jedoch weder die  $\beta$ - noch die  $\gamma$ -Isoform (Di Iorio et al., 2005). Auch bei unseren Haussäugetieren lässt sich die Hornhaut durch anti-p63 anfärben. Beim Pferd befinden sich die kornealen Stammzellen im Limbusbereich, wo auch die Melanozyten (Pigmentzellen der Haut) sitzen. Hier werden die Zellkerne der ersten zwei bis drei basalen Epithelzellschichten markiert. Im Zentrum der Hornhaut kann analog zum Menschen kein p63 in den Zellen nachgewiesen werden (Moriyama et al., 2013). Beim Hund hingegen verteilt sich p63 im gesamten Hornhautepithel, wobei eine höhere Expression im Limbus, v.a. in den basalen Zelllagen stattfindet (Morita et al., 2014).

## **2.7 Mitosemarker-Proteine**

### **2.7.1 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)**

PCNA (proliferating cell nuclear antigen), auch bekannt als Cyclin (Mathews et al., 1984) oder Polymerase- $\delta$ -Hilfsprotein (Prelich et al., 1987) ist in proliferierenden Geweben vorhanden (Hall et al., 1990). Das intranukleäre Protein (Waseem und Lane, 1990) kann zur Darstellung der Zellkinetik und -differenzierung herangezogen werden. PCNA wird in Zellen exprimiert, die sich in der G<sub>1</sub>-, S- oder G<sub>2</sub>-Phase befinden (Casasco et al., 1993). Der Zellkern wird insbesondere in der späten G<sub>1</sub>-Phase bis zur S-Phase deutlich angefärbt (Takasaki et al., 1981). Bei PCNA handelt es sich um ein 29 kDa schweres Monomer, das sich zu einem Homotrimer zusammenlagert (Krishna et al., 1994). Der trimere Komplex ist entscheidend für

die Interaktion mit der DNA-Polymerase- $\delta$  (Jónsson et al., 1995), die für die Replikation der DNA von großer Wichtigkeit ist (Bauer und Burgers, 1990).

Der monoklonale Antikörper gegen PCNA wird sowohl zur Tumordiagnostik (Goldsworthy et al., 1993) als auch zur allgemeinen Untersuchung von proliferierenden Geweben verwendet (Hall et al., 1990). Anti-PCNA ist neben der Haut und der Skelettmuskulatur bereits auch in okularem Gewebe, u. a. in der Hornhaut verwendet worden, um die Replikationsrate zu untersuchen (Yamaguchi und Stell, 1994). So konnte in der Kaninchenhornhaut eine Mitoserate von 4 % in der basalen Epithelzellschicht ermittelt werden. Ein Unterschied in der Mitoseaktivität zwischen zentraler und peripherer Hornhaut konnte bei dieser Untersuchung nicht ermittelt werden (Yamada und Mashima, 1995).

### **2.7.2 Phosphohiston H3 (PHH3)**

Im Zellkern eukaryotischer Zellen befinden sich DNS-bindende Proteine, die Histone (Bhasin et al., 2006). Die in fünf Hauptklassen unterteilbaren Histone, darunter auch das Histon H3, sind für die unterschiedlichen Funktionszustände des Chromatins zuständig (Ribalta et al., 2004; Wiedemann et al., 2010). Durch Modifikationen wie z.B. Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung der Histone wird die Chromatinstruktur im Zellkern verändert, wodurch u. a. die Genexpression reguliert wird (Gershey et al., 1968; Hooper und Smith, 1973; Marks et al., 1973; Hake et al. 2006). Das phosphorylierte Histon H3 steuert die Kondensation des Chromatins während der M-Phase (Mitose) (Gurley et al., 1978; Hendzel et al., 1997). Der Antikörper für das phosphorylierte Histon H3 (PHH3, Phosphorhiston H3) ist bereits als spezifischer Mitosezellmarker mit anderen Mitosemarkern verglichen worden (Colman et al., 2006). Im Gegensatz zu den Mitosemarkern wie z.B. Ki-67 oder PCNA, die nahezu alle Phasen des mitotischen Zellzyklus anfärben, markiert anti-PHH3 nur Zellen, die sich in der M-Phase befinden und ist somit spezifischer für den mitotischen Teilungsprozess (Juan et al., 1998; Yang, 2011). Die sich in der Apoptose befindenden Zellen werden mit anti-PHH3 nicht markiert, da das Histon H3 zur Einleitung der Apoptose nicht phosphoryliert werden muss, um den Kondensationszustand des Chromatins zu erlangen (Hendzel et al., 1998; Nasr und El-Zammar, 2008). In der wissenschaftlichen Literatur wurde das Vorkommen von PHH3 in der Hornhaut unserer Haussäugetiere bis dato ausschließlich bei der Maus erwähnt (Dorà et al., 2008).

## 2.8 Claudin-1

Claudin-1 wurde gemeinsam mit Claudin-2 zum ersten Mal im Jahre 1998 von Furuse et al. beschrieben und mit den tight junctions in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich bei Claudin-1 um ein 22 kDa schweres Transmembranprotein (Furuse et al., 1998a), das einer aus 24 Subtypen bestehenden Familie der Claudine angehört (Ban et al., 2003, Yoshida et al., 2009). Die Claudine sind maßgeblich am Aufbau der Verschlussleisten, der sogenannten tight junctions, beteiligt (Tsukita und Furuse, 1999). Über die tight junctions werden epitheliale und endotheliale Zell-Zell-Verbindungen geschaffen (Tsukita et al., 2001), die eine Barriere- und Zaunfunktion aufweisen (Morita et al., 1999). So regulieren sie als Barriere die parazelluläre Permeabilität und trennen zusätzlich als Zaun die apikale Membran von den lateralen Membranabschnitten, sodass die Zellmembran polarisiert wird (Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989). Der Grundaufbau der Claudine ähnelt sich mit je vier transmembranösen Domänen bei allen Claudin-Subtypen (Morita et al., 1999). Außerdem bilden die Claudine eine Familie, die sich durch ein gewebespezifisches Verteilungsmuster auszeichnet (Ban et al., 2003; Yoshida et al., 2009). Claudin-1 besitzt in der Epidermis eine große Bedeutung. Über die tight junctions wird der zum Überleben wichtige Wasserhaushalt der Haut entscheidend reguliert (Furuse et al., 2002). Neben der Haut kommen Claudine in vielen weiteren Epithelien vor, wie z.B. in dem des Zahnfleisches, der Zunge oder der Scheide (Langbein et al., 2002). Auch in der Hornhaut bilden die Claudine eine Schutzbarriere. In humanem und murinem Hornhautepithel detektiert anti-Claudin-1 überwiegend die Basal- und Flügelzelllagen. Dabei nimmt die Intensität zu oberflächlichen Schichten hin ab (Yi et al., 2000; Ban et al., 2003). Im *Stratum superficiale* zeigt sich nur noch ein punktförmiges Expressionsmuster (Sosnová-Netuková et al., 2007), die sogenannten kissing points (Tsukita und Furuse, 1999). Neben Claudin-1 kommen im Hornhautepithel noch acht weitere Claudin-Subtypen vor (Ban et al., 2003). Beim Menschen lässt sich zusätzlich eine Claudinexpression im Endothel nachweisen (Inagaki et al., 2013), wohingegen bei der Maus kein Claudin im Endothel detektiert werden konnte (Sosnová-Netuková et al., 2007).

## 2.9 Aquaporine

Anfang der 1990er Jahre wurde aus humanen Erythrozyten und renalen Tubuluszellen ein integrales Membranprotein mit dem Namen CHIP28 (channel-forming integral protein, 28 kDa) isoliert, das zum transmembranen Wassertransport befähigt ist (Preston und Agre, 1991). Später wurde CHIP28 der neu entdeckten Klasse der Aquaporine (AQP) zugeordnet (Maeda et al., 1995). Die AQP bilden eine Familie von kleinen integrierten Membranproteinen, die je Monomer ca. 30 kDa aufweisen. Sie kommen weitverbreitet sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich vor (Verkman, 2005). Bei den Säugetieren wurden bereits mehr als zehn Isoformen der AQP beschrieben (Karasawa et al., 2011). AQP können in drei Subtypen klassifiziert werden, die sich an ihrer Kanaldurchlässigkeit orientieren. So zählt Rojek et al. (2008) zu den klassischen AQP (AQP1, AQP2, AQP4 und AQP5) diejenigen, die ausschließlich Wasser durch die Zellmembran schleusen. AQP3, AQP7 und AQP9 werden zu den sogenannten Aquaglyceroporinen gerechnet. Sie sind neben Wasser auch für kleine gelöste, ungeladene Moleküle wie zum Beispiel Glycerin und Harnstoff durchlässig. Für die dritte Gruppe, den unorthodoxen AQP (AQP6, AQP8 und AQP11) ist die Transportfähigkeit noch nicht ausreichend geklärt (Rojek et al., 2008). Das AQP1 entspricht dem CHIP28 und wurde auf molekularer Ebene am ausführlichsten charakterisiert (Jung et al., 1994). AQP1 stellt ein Tetramer dar, welches sich aus vier homogenen Monomeren zusammensetzt (de Groot et al., 2003). Dabei ist jedes Monomer aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut, die jeweils aus einer rechtsgedrehten  $\alpha$ -Helix bestehen und über fünf Schleifen (loops, A-E) miteinander verbunden sind (Preston et al., 1994; Ren et al., 2000). Sowohl die Schleife B (zytoplasmatisch) als auch die Schleife E (extrazellulär) enthält ein Aminosäuremotiv aus Asn-Pro-Ala, das jeweils eine Halbpore bildet. Jene Abschnitte lagern sich nach einem Sanduhrmodell zu einer Pore zusammen und lassen jeweils pro Monomer Wasser ohne Energieverbrauch passieren (Jung et al., 1994). AQP sind streng selektive Wassertransporter. Sogar Protonen werden blockiert und können die Kanäle nicht passieren, wodurch der wichtige Protonengradient entlang der Zellmembran erhalten bleibt (Fujiyoshi et al., 2002). Die Fließrichtung durch die Wasserkanäle wird über einen osmotischen Gradienten bestimmt (Sui et al., 2001) und kann folglich bidirektional sein (Meinild et al., 1998).

Im okularen Gewebe besitzen AQP eine wichtige Bedeutung. So werden AQP1 und AQP4 im Ziliarkörper und trabekulären Maschenwerk exprimiert, die im Auge die Produktion und den Abfluss des Kammerwassers regeln. Insofern sind AQP daran mitbeteiligt, den intraokularen Druck zu regeln (Patil et al., 1997; Zhang et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Wasseraustausch im Auge geschieht über das Hornhautepithel (Levin und Verkman, 2004). Durch den intraokularen Druck des Kammerwassers nimmt die Hornhaut, die sich physiologisch in einem relativen dehydrierten Zustand befindet, über das Endothel stetig Wasser auf. Der hypertone Tränenfilm erzeugt indessen an der Hornhautoberfläche den osmotischen Gradienten und entzieht der Hornhaut das Wasser, sodass der Quellungszustand und somit die Transparenz konstant bleibt. Daher quillt die Hornhaut bei geschlossenem Auge aufgrund der fehlenden Verdunstung um bis zu 4 % auf (Mandell und Fatt, 1965). Der Wasserstrom hierfür findet hauptsächlich über AQP1 und AQP5 statt (Thiagarajah und Verkman, 2002). AQP5 ist auf der Oberfläche des humanen Hornhautepithels verteilt (Funaki et al., 1998) und wurde bereits ebenso bei der Ratte, Hund und Rind nachgewiesen. Des Weiteren wird AQP1 in der *Iris* und im Ziliarkörper sowie AQP5 in der *Conjunctiva* exprimiert (Zhang und Wang, 2007; Karasawa et al., 2011; Yu et al., 2012). Neben der apikalen und basolateralen Expression im Endothel ist AQP1 zusätzlich in den Keratozyten lokalisiert (Wen et al., 2001).

### 2.10 Elastin

Elastische Fasern bilden ein verzweigtes Netzwerk und verleihen dem Gewebe durch ihre Zugfestigkeit Elastizität bei gleichzeitiger Stabilität (Junqueira und Carneiro, 1986). Aufgebaut sind die elastischen Fasern größtenteils aus einem Kern aus amorphem Elastin, der von Mikrofibrillen ummantelt wird (Alexander und Garner, 1983). Das quervernetzte Protein Elastin ist hauptsächlich für die elastische Eigenschaft der Fasern verantwortlich und ist Bestandteil der extrazellulären Matrix (Li und Daggett, 2002). Elastin setzt sich aus mehreren Untereinheiten Tropoelastin zusammen, die zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind (Debelle und Alix, 1999). Das bovine Tropoelastin mit einer molekularen Masse von ca. 62 kDa (Raju und Anwar, 1987) weist zwei charakteristische, sich abwechselnde Domänen auf, die auch bei anderen Spezies zu finden sind. Zum einen bilden Wiederholungseinheiten aus den Aminosäuren Alanin und Lysin eine hydrophile quervernetzte Domäne, zum anderen

entsteht aus Sequenzen mit Valin, Prolin und Glycin eine hydrophobe Domäne, die für die Elastizität verantwortlich ist. Letztere bildet eine kompakte amorphe Struktur aus verdrehten  $\beta$ -Faltblattsträngen, die Wasser binden kann (Li und Daggett, 2002; Urry und Parker, 2002). Neben der etwa 40 %  $\beta$ -Faltblattstruktur weist die räumliche Anordnung von Elastin im festen Zustand eine zu ca. 10 %  $\alpha$ -helikale und 50 % undefinierte Konformation auf (Debelle und Alix, 1999). Die  $\beta$ -Faltblattstruktur ist dabei von großer Wichtigkeit, da die elastische Eigenschaft von Elastin erst im hydratisierten Zustand entsteht (Gosline, 1978). Ein von Wrenn et al. (1986) beschriebener monoklonaler Antikörper kann ungelöstes Elastin,  $\alpha$ -Elastin, Tropoelastin sowie Peptidfragmente des Elastins detektieren, indem er an die sich wiederholende Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Domäne bindet (Wrenn et al., 1986). Die hohe Belastbarkeit von Geweben wie der Haut, den Arterien oder der Lunge ist u. a. dem Elastin zu verdanken (Sage und Gray, 1980). Auch im Hornhautgewebe konnten elastische Fasern nachgewiesen werden, wobei unklar bleibt, ob Elastin daran mitbeteiligt ist. Diese elastischen Fasern werden vornehmlich in der Peripherie des hinteren Hornhautstromas exprimiert (Alexander und Garner, 1983; Kamma-Lorger et. al., 2010).

## 2.11 Kollagen Typ VIII

Kollagene bilden die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix und sorgen für eine strukturelle Gewebeintegrität (Kittelberger et al., 1990; Gordon und Hahn, 2010). Mehr als zwölf verschiedene Kollagen-Typen wurden bereits in Geweben von Säugetieren identifiziert (Marshall et al., 1993), die sich einer fibrillären oder nicht-fibrillären Kollagen-Gruppe zuordnen lassen. Letztere erzeugt häufig eine plastische Struktur (Brinkmann, 2001). Die Hornhaut besteht zu 71 % der Trockenmasse aus Kollagen, wobei der größte Anteil das Kollagen Typ I darstellt (Marshall et al., 1993). Das zuerst aus bovinen Endothelzellen der Aorta isolierte Kollagen Typ VIII (anfangs EC, endothelial collagen) (Sage et al., 1980; Sage et al., 1983) stellt in der Descemetischen Membran das dominierende Kollagen dar (Kittelberger et al., 1990) und zählt zu den netzbildenden (nicht-fibrillären) Kollagenen (Gordon und Hahn, 2010). Produziert wird das Kollagen Typ VIII dort von den kornealen Endothelzellen (Benya und Padilla, 1986; Kapoor et al., 1986). Das Kollagen Typ VIII hat die Form einer Tripelhelix, die sich aus den zwei Untereinheiten  $\alpha 1(\text{VIII})$  und  $\alpha 2(\text{VIII})$  im Verhältnis 2:1 zusammensetzt (Muragaki et al., 1991). Jede Untereinheit stellt eine kurze

stäbchenförmige Kollagen- $\alpha$ -Kette mit einem knaufähnlichen Ende dar und weist eine molekulare Masse von 61 kDa auf (Benya und Padilla, 1986; Yamaguchi et al., 1991). Die Descemetsche Membran weicht vom Grundbauplan der klassischen Basalmembran ab, indem das Kollagen Typ VIII ein hexagonales Gitternetz bildet (Kapoor et al., 1986; Sawada et al., 1990). In der humanen Hornhaut markiert der monoklonale Antikörper für Kollagen Typ VIII v.a. das vordere Drittel der Descemetschen Membran, wohingegen beim Rind die gesamte Membran angefärbt wird (Sawada et al., 1990; Tamura et al., 1991).



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Untersuchungsmaterial**

Insgesamt wurden für diese Arbeit für die rasterelektronen- und lichtmikroskopischen Untersuchungen die Hornhäute von 28 Schweinen (0,5 - 3 Jahre), 11 Rindern (1,5 - 4 Jahre), zwei Ziegen (8 Jahre), sechs Pferden (4 - 27 Jahre), vier Hunden (3 - 15 Jahre) und fünf Katzen (1 - 16 Jahre) verwendet. Dabei wurden Hornhäute sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts untersucht. Es konnte je Tier stets die Hornhaut beider Augen entnommen werden. Die Schweine- und Ziegenhornhäute wurden teils aus dem Tierbestand der Institute für Tierernährung sowie Tierhaltung und Tierzucht im Rahmen unterschiedlicher Versuchsvorhaben zur Verfügung gestellt. Der andere Teil stammte aus der Schlachtung der Metzgerei Vogelmann in Bubenorbis. Hier konnten auch die Rinderproben gewonnen werden. Die equinen Hornhäute wurden während des Schlachtprozesses der Metzgerei Beerwart in Waiblingen entnommen. Die Probenentnahme bei Fleischfressern (Hund und Katze) wurde in der Tierklinik der Universität Hohenheim durchgeführt. Alle untersuchten Proben stammten ausschließlich von Tieren ohne bekannte ophthalmologische Vorerkrankungen und hatten am Tag der Entnahme grobsinnlich gesunde Augen.

### **3.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung**

Unmittelbar nach dem Entbluten der Schlachttiere bzw. der Euthanasie der weiteren Tiere erfolgte die Probenentnahme. Die Hunde und Katzen wurden aufgrund nichtheilbarer Erkrankungen, die nicht im Zusammenhang mit der Augengesundheit standen, euthanasiert. Zuerst wurden die Hunde und Katzen mit einer Kombination aus Ketaminhydrochlorid, 8-10 mg/kg KGW (Ursotamin<sup>®</sup>, Fa. Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg) und Xylazin, 1-2 mg/kg KGW (Rompun<sup>®</sup>, Fa. Bayer AG, Leverkusen) in einer Mischspritze i.m. in Narkose gelegt und anschließend nach dem Erreichen des Narkosestadiums mittels Pentobarbital (Narkodorm<sup>®</sup>, Fa. CP-Pharma GmbH, Burgdorf) mit der Richtdosis 50-60 mg/kg KGW i.v. euthanasiert. Ein Teil der Schweine wurde mittels einer intramuskulären Injektion von 2,0 mg/kg KGW Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und 15,0 mg/kg KGW

Ketaminhydrochlorid (Ursotamin<sup>®</sup>, Fa. Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg) anästhesiert und daraufhin mit Natrium-Pentobarbital (Narkodorm<sup>®</sup>, Fa. CP-Pharma GmbH, Burgdorf) mit der Richtdosis 50-60 mg/kg KGW i.v. euthanasiert.

Nach Eintritt des Todes wurde die Hornhaut bei gespreizten Augenlidern unter äußerster Sorgfalt zur Schonung des Epithels und Endothels mit einem ca. 1 cm dicken Skleralring direkt vom Augapfel abgesetzt. Eine Hälfte der Proben wurde in handwarmer PBS (phosphate buffered saline)-Pufferlösung (pH 7,4) gespült und daraufhin unverzüglich für die Rasterelektronenmikroskopie in 2,5 % GAH (Glutardialdehyd)-Lösung überführt sowie über Nacht bei Raumtemperatur fixiert. Um den Tränenfilm vollständig von der Hornhautoberfläche zu entfernen, wurden die Proben in einem Ultraschallbad (Emmi 40 HC, Emmag AG, Mörfelden-Walldorf) für 10 bis 30 Sekunden behandelt. Ein Teil der für das Rasterelektronenmikroskop bestimmten Proben wurde nach der GAH-Fixierung zusätzlich über einen Zeitraum von 30 bis 360 Minuten in 4 % Kalilauge (KOH) mazeriert, um tiefere Schichten der Hornhaut darzustellen. Desweiteren wurden Gefrierbrüche angefertigt, indem die Proben für einige Sekunden in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) gebadet und darauffolgend an einer Kante gebrochen wurden.

Durch die Immersionsfixierung in Bouin'scher Lösung (über 48 Stunden) bzw. in Methanol/Eisessig (M/E) im Verhältnis 2:1 (über 24 Stunden) wurde ein weiterer Teil der Proben nach der Reinigung in PBS-Pufferlösung für die Lichtmikroskopie und die Immunhistochemie aufbereitet (Mulisch und Welsch, 2010).

### 3.3 Histologie

Die für die Lichtmikroskopie und Immunhistochemie vorgesehenen Proben wurden nach der Fixation in Bouin'scher Lösung bzw. M/E-Lösung über 26 Stunden in einer aufsteigenden Alkoholreihe mithilfe eines Gewebefiltrationsautomaten (TP 1020, Fa. Leica, Bensheim) dehydriert. Bevor 2 µm dünne Schnitte mit einem elektrischen Rotationsmikrotom (Microm HM350, Heidelberg) angefertigt werden konnten, wurden die entwässerten Proben in einer Paraffinausgießstation (EG 1160, Fa. Leica, Bensheim) in flüssiges Paraplast<sup>®</sup> (Sherwood Medical CO., USA) eingebettet und anschließend ausgekühlt. Die feinen Gewebeschnitte wurden zur einen Hälfte auf Superfrost<sup>®</sup>-Objektträger (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) und

zur anderen Hälfte auf mikrowelleneignete Superfrost®-adhäsiv-Objektträger (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Bevor die Probenschnitte gefärbt bzw. für die immunhistochemischen Tests herangezogen werden konnten, wurden sie im Wärmeschränk über Nacht getrocknet. Um eine Übersicht über die Schnitte zu gewinnen, folgte eine Hämatoxilin-Eosin-(H.E.)-Färbung sowie zur Darstellung komplexer Kohlenhydrate eine PAS-Reaktion (Mulisch und Welsch, 2010). Als Vorbereitung auf die Färbungen und Tests wurden die Schnitte in Xylol von Paraffin gelöst und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Nach entsprechend durchgeführten Färbungen bzw. im Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere etablierten immunhistochemischen Tests wurden die histologischen Schnitte mit Entellan® (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckt, nachdem sie zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe durchliefen.

### 3.4 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Tests wurden mithilfe der Labelled-Streptavidin-Biotin-(LSAB)-Methode durchgeführt, um die in Tabelle 1 aufgeführten Antigene zu detektieren. Diese Methode, eine Fortentwicklung der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-(ABC)-Methode (Hsu et al., 1981) mit einer vier- bis achtmal höheren Sensitivität (Giorno, 1984), weist eine besonders hohe Affinität zu Biotin auf. Das Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) bindet über vier Bindungsstellen das Biotin, das dem Sekundärantikörper (Brückenantikörper) anhaftet. Da das Streptavidin eine Enzymmarkierung aus Meerrettichperoxidase trägt, kann es nach Zugabe eines Chromogens durch die Peroxidase-Aktivität visualisiert werden.

Die Immunhistochemie wurde gemäß dem am Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere der Universität Hohenheim etablierten Protokoll ausgeführt. Im Anschluss an die Rehydrierung wurden die Objektträger für den Nachweis von AQP5, Claudin-1, Elastin, PCNA und p63 zusätzlich in 10 mM Zitratpuffer (pH 6) Mikrowellen (NN-5256, Panasonic) ausgesetzt, um antigene Bindungsstellen zu demaskieren. Mit 10 % Hydrogenperoxidlösung wurde daraufhin die endogene Peroxidase gehemmt, bevor die am Primärantikörper unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation für 30 Minuten in einem 1:10 verdünnten Normalserum (Pferd) blockiert wurden. Die Schnitte kamen bei 4 °C über Nacht mit einem verdünnt aufgetragenen Primärantikörper (Tab. 1) in eine Feuchtkammer (Fa. Shandon,

Frankfurt am Main). Tags darauf wurde nach Abgießen des Primärantikörpers der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper für 30 Minuten aufgetragen (Tab. 1), der sich anschließend während einer 30-minütigen Inkubation mit dem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (DAKO®, Fa. Millipore, Schwalbach) verbunden hat. Zur visuellen Darstellung der Immunreaktion wurden die Schnitte im Dunklen für 10 Minuten in 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung gestellt und die Zellkerne abschließend mit Hämalaun (Mulisch und Welsch, 2010) blau gegengefärbt. Um die histologischen Präparate zwischen den einzelnen Schritten von den zuvor verwendeten Reagenzien zu befreien, wurden sie jeweils dreimalig in PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen.

Mittels einer Positivkontrolle (K0) wurde eine spezifische Reaktion des Primärantikörpers überprüft. Dafür wurden folgende Organe, für die vorab eine entsprechend positive Reaktion bestätigt wurde, getestet: Jejunum vom Schwein (CK1 und CK2), Ovar vom Schwein (CK3/2p), Ileocaecaltonsille vom Huhn (PCNA), Mamma vom Schwein (PHH3), Niere vom Schwein (AQP1), Duodenum vom Schwein (AQP5), Aorta vom Schwein (Elastin), Niere vom Schwein (Kollagen Typ VIII), Duodenum vom Schwein (Claudin-1) und Zunge vom Rind (p63). Gleichzeitig wurde zur Negativkontrolle jeweils bei einem Hornhautschnitt darauf verzichtet den Primärantikörper (K1), den Sekundärantikörper (K2) und die Streptavidin-Meerrettichperoxidase (K3) zu inkubieren.

**Tab. 1:** Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Antigen	Verdünnung Primär-AK	Immunogen	Host	Sekundär-AK biotinyliert	Hersteller
<b>Cytokeratin 1 (CK1)</b> monoklonal	1:800	CK1 aus E. Coli-Stamm	Maus	Anti-Maus IgG, Kaninchen	Novus Biologicals, Cambridge, UK
<b>Cytokeratin 2 (CK2)</b> polyklonal	1:200	Humanes CK2	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG, Ziege	Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
<b>Cytokeratin 3/2p [AE5] (CK3/2p)</b> monoklonal	1:100	CK3/2p aus Kaninchen-Hornhautepithel	Maus	Anti-Maus IgG, Kaninchen	Santa Cruz Biotech., Dallas, USA
<b>Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</b> monoklonal	1:1000	PCNA aus Kaninchen-Thymus	Maus	Anti-Maus IgG, Kaninchen	Linaris, Wertheim-Bettingen
<b>Phospho-histon H3 (PHH3)</b> polyklonal	1:200	Humanes H3 bei Ser 10	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG, Ziege	Cell Marque, Rocklin, USA
<b>Aquaporin 1 (AQP1)</b> polyklonal	1:200	Humanes AQP1 (Ag14093)	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG, Ziege	Proteintech, Chicago, USA
<b>Aquaporin 5 (AQP5)</b> monoklonal	1:150	Humanes AQP 5	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG, Ziege	Novus Biologicals, Cambridge, UK
<b>Anti-Elastin [Clone BA-4]</b> monoklonal	1:1000	Bovines $\alpha$ -Elastin	Maus	Anti-Maus IgG, Kaninchen	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Kollagen Typ VIII [COL8A1]</b> polyklonal	1:100	Humanes COL8A1 aus N-terminaler Region	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG, Ziege	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Claudin-1</b> polyklonal	1:150	Humanes Claudin-1 aus C-terminaler Region	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG, Ziege	Zytomed Systems, Berlin
<b>p63 [Clone Y4A3]</b> monoklonal	1:100	Murines p63 aus N-Terminus	Maus	Anti-Maus IgG, Kaninchen	Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA

### **3.5 Rasterelektronenmikroskopie**

Nach der Fixierung der Proben in 2,5 % GAH-Lösung bzw. der Mazeration in KOH wurden die Proben nach einem etablierten Entwässerungsprotokoll des Instituts behandelt. Dabei wurden die Proben nach dreimaligem Spülen in PBS-Pufferlösung für jeweils eine Stunde in 50 %, 70 % und 80 % Ethanol überführt. Zur weiteren Entwässerung wechselten die Proben daraufhin jeweils viermal für 30 Minuten in 90 %, 99 % und 100 % Ethanol und lagerten anschließend über Nacht bei 4 °C in 100 % Ethanol. Nach der Gewebeentwässerung wurden die runden Hornhautproben geviertelt und zum Trocknen in den Critical-Point-Dryer (Typ CPD 030, Fa. Bal-Tec, Witten) verbracht. Für den folgenden etappenweisen Austausch von Alkohol durch Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) war die Entwässerung von großer Bedeutung. Das CO<sub>2</sub> ermöglicht es, die Proben an einem leicht zu erreichenden kritischen Punkt schonend zu trocknen. Für CO<sub>2</sub> liegt der kritische Punkt bei 31 °C und 72 bar, wohingegen er für Wasser nur unter hohem Aufwand bei 374 °C und 217 bar erreicht werden kann (Horridge und Tamm, 1969). Bevor die Proben zur Goldbeschichtung in den Sputter Coater (Typ SCD 050, Fa. Bal-Tec, Witten) gesetzt werden konnten, wurden sie mit dem Leit-C-Kleber (Neubauer Chemikalien, Münster) auf Probenhalter (Fa. Agar Scientific Ltd., Essex) geklebt. Der Sputter Coater erzeugte unter annähernd reiner Argonatmosphäre bei einer Stromstärke von 40 µA durch Kathodenzerstäubung eine diffuse Goldwolke, die eine dünne, thermisch und elektrisch leitfähige Goldschicht über die Probe zog. Dieser Besputterungsvorgang wurde bei geraden wie auch schräg gestellten Probenhaltern in verschiedenen Winkeln bei gleichbleibendem Abstand von 5,5 cm zur Probe mehrmals durchgeführt.

### **3.6 Licht- und rasterelektronenmikroskopische Auswertung**

Die lichtmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Präparate wurden deskriptiv ausgewertet. Hierfür wurde für die Lichtmikroskopie ein Mikroskop des Typs Laborlux S (Fa. Leitz, Wetzlar) verwendet. Schwerpunkt lag auf der Betrachtung der tierartigen Unterschiede. Mittels der am Mikroskop des Typs DMRBE (Fa. Leica, Bensheim) angeschlossenen Digitalkamera TYP DFC 420C (Leica, Bensheim) wurden ausgewählte Präparate fotografisch dokumentiert. Zur weiteren Bearbeitung standen das „Image Processing and Analysis“ (IPA)-Programm sowie die Adobe Photoshop Version<sup>®</sup> CS5 (Fa. Adobe Systems GmbH, München) zur Verfügung. Bei der Beurteilung einiger Immuntests

wurde die Häufigkeit von immunhistochemisch markierten Zellen sowie die Intensität der Reaktion semiquantitativ (Tab. 2) in Anlehnung an Telgen (2009) bewertet.

**Tab. 2:** Semiquantitative Bewertung der Häufigkeit und Intensität.

Häufigkeit		Intensität
Keine	--	negativ
einzelne (< 10 %)	+/-	schwach
wenige (< 50 %)	+	moderat
viele (< 80 %)	++	deutlich
zahlreiche (> 80 %)	+++	stark

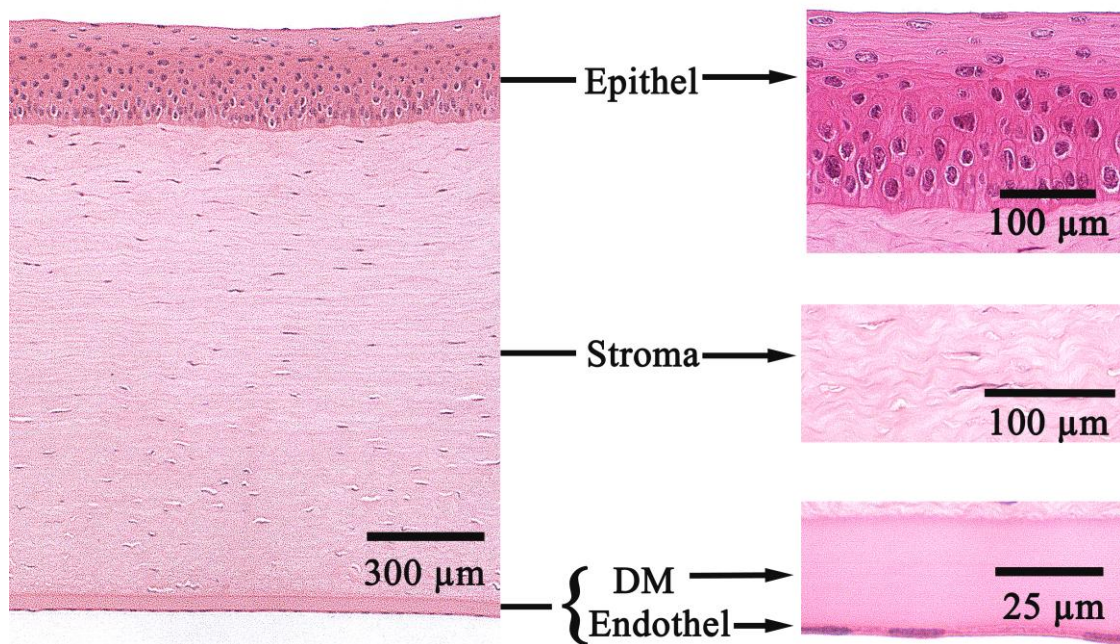
Vergleichende morphologische Messungen der Hornhaut fanden unter Verwendung des Programmes „Leica Application Suite“ Version 2.8.1 (Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Schweiz) statt. Je Tierart wurden an vier (bei der Ziege an zwei) verschiedenen Tieren jeweils fünf Punkte vermessen. Zwei Punkte wurden in der Zentralregion ausgewählt, zwei von ihnen in der Peripherie und ein Messpunkt lag in der limbalen Region. Für die statistische Auswertung wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung berechnet. Die ermittelten Werte sollen aufgrund der insgesamt kleinen Tierzahlen nur zur Orientierung der Höhenunterschiede zwischen den einzelnen Tierarten dienen.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Hornhautstrukturen geschah an einem Rasterelektronenmikroskop (Typ DSM 940 A, Fa. Zeiss, Oberkochen) mit dazugehörigem PC. Neben der Betrachtung des vorderen und hinteren Hornhautepithels wurden auch Proben untersucht, die eine Mazeration durchliefen bzw. durch eine Gefriermethode behandelt wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histomorphologie

In der lichtmikroskopischen Betrachtung kann bei allen untersuchten Säugetierspezies eine charakteristische vierteilige Schichtung der Hornhaut bestehend aus Hornhautepithel, Stroma, Descemetscher Membran und Hornhautendothel festgestellt werden. Wie im Querschnitt der Hornhaut bei der Ziege exemplarisch gezeigt wird, stellt das Stroma deutlich erkennbar die dickste Schicht innerhalb der Hornhaut dar (Abb. 4).

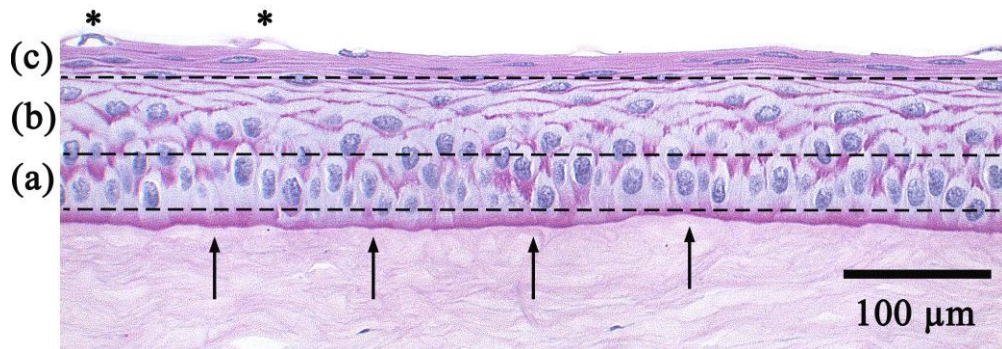


**Abb. 4:** Querschnitt durch die Hornhaut einer Ziege. Detailaufnahmen von Epithel, Stroma und Endothel mit Descemetscher Membran (DM). Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Das vordere Hornhautepithel ist ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel, innerhalb dessen sich tierartenübergreifend drei *Strata* voneinander unterscheiden lassen (Abb. 5). Das einschichtige *Stratum basale* sitzt einer Basalmembran auf und wird von einem mehrschichtigen *Stratum intermedium* zur Hornhautoberfläche hin fortgesetzt. Abschließend



bilden die sich immer mehr abplattenden Zellen das *Stratum superficiale*, das im Zuge der Desquamation einzelne schuppenartige Oberflächenepithelzellen in den präkornealen Tränenfilm abgibt.



**Abb. 5:** Die drei Schichten des vorderen Hornhautepithels mit einer durchgehend angefärbten Basalmembran (↑) beim Hund. (a) *Stratum basale*; (b) *Stratum intermedium*; (c) *Stratum superficiale*; (\*) beginnende Desquamation. PAS-Reaktion.

Das histologische Bild des vorderen Hornhautepithels differenziert sich deutlich in der Ausgestaltung der drei Epithelschichten innerhalb der untersuchten Haussäugetiere. Die Katze besitzt gemeinsam mit dem Hund mit einem im Mittel 87,2  $\mu\text{m}$  und 124,5  $\mu\text{m}$  hohen Epithel das niedrigste Hornhautepithel. Im Vergleich zum Fleischfresser weist das Pferd mit einem Mittelwert von 286,1  $\mu\text{m}$  ein zwei- bis dreifach höheres Epithel auf. Die Mittelwertmessungen beim Schwein von 158,0  $\mu\text{m}$ , bei der Ziege von 184,4  $\mu\text{m}$  und beim Rind von 278,2  $\mu\text{m}$  liegen zwischen den zwei Extremwerten von Katze und Pferd (Tab. A1). Die Fleischfresser besitzen mit sechs bis neun Zellreihen die wenigsten Zelllagen und unterscheiden sich markant vom Pferd, das insgesamt zwölf bis fünfzehn Zelllagen aufweist (Abb. 6). Ähnlich wie das Pferd hat das Rind ein ausgeprägtes Hornhautepithel bestehend aus elf bis fünfzehn Zelllagen. Ziege und Schwein besitzen hingegen mit acht bis zwölf Lagen etwas weniger Zellschichten (Abb. 7).



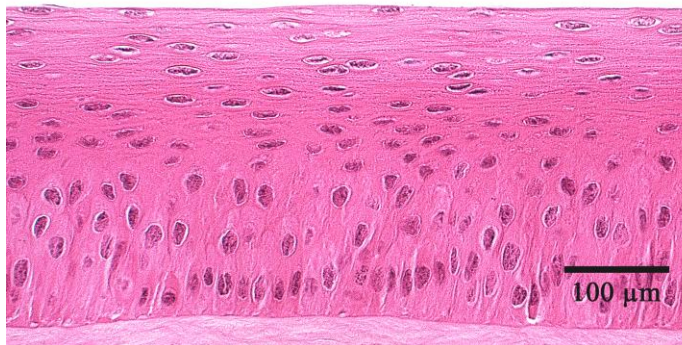
### Katze

Das isoprismatische *Stratum basale* weist vorzugsweise runde Zellkerne auf.



### Hund

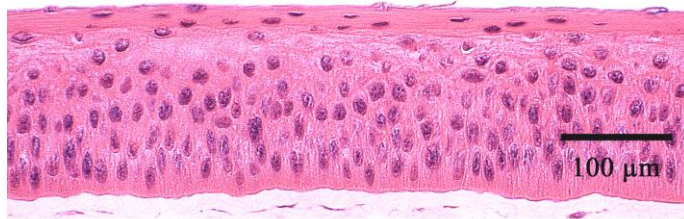
Die längsovalen Zellkerne des *Stratum basale* befinden sich überwiegend apikal. Beginnende Desquamation (\*).



### Pferd

Der Übergang vom *Stratum intermedium* zum *Stratum superficiale* verläuft fließend.

**Abb. 6:** Vergleichende Darstellung des vorderen Hornhautepithels von Katze, Hund und Pferd im Zentrum der Hornhaut. Das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel variiert tierartenspezifisch beträchtlich in der Anzahl der Zellschichten. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.



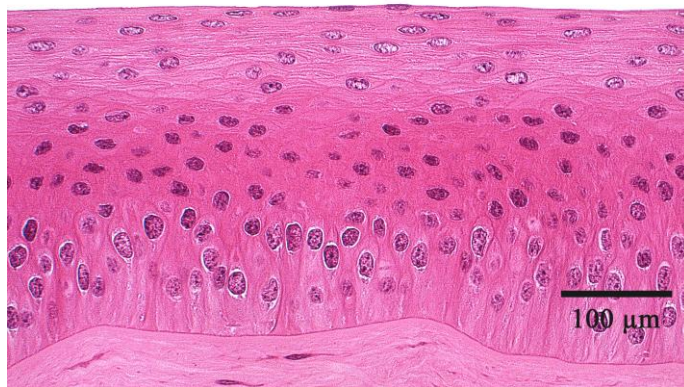
### Schwein

Dicht gepacktes *Stratum basale* und *Stratum intermedium*.



### Ziege

Das *Stratum intermedium* besitzt Flügelzellen (↑) mit fingerartigen Fortsätzen (Insert).



### Rind

Dem mehrstufigen *Stratum basale* folgt ein mit sieben bis neun Zelllagen deutlich ausgeprägtes *Stratum intermedium*.

**Abb. 7:** Vergleichende Darstellung des vorderen Hornhautepithels von Schwein, Ziege und Rind im Zentrum der Hornhaut. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.

Das einreihige *Stratum basale* bildet die Grundlage des Hornhautepithels und sitzt einer feinen, durchgehenden Basalmembran auf. Im Gegensatz zu den Pflanzenfressern ist sie bei den Fleischfressern und dem Schwein etwas deutlicher ausgebildet. Sie lässt sich jedoch trotz positiver PAS-Reaktion nicht scharf als eigenständige Hornhautschicht (Bowmansche Membran) abgrenzen (Abb. 5). Bei der Katze besteht das *Stratum basale* aus isoprismatischen Zellen (Abb. 6). Mit Ausnahme der Ziege, die iso- bis hochprismatische Zellen vorweist, besitzen die übrigen Spezies eine hochprismatische Zellreihe (Tab. 3). Insbesondere beim Rind liegen die längsovalen Zellkerne in mehrstufigen Ebenen vor (Abb. 7) und befinden sich überwiegend im apikalen Zellpol, wohingegen bei der Katze die runden Zellkerne zentral lokalisiert und perlschnurartig aneinandergereiht sind (Abb. 6).

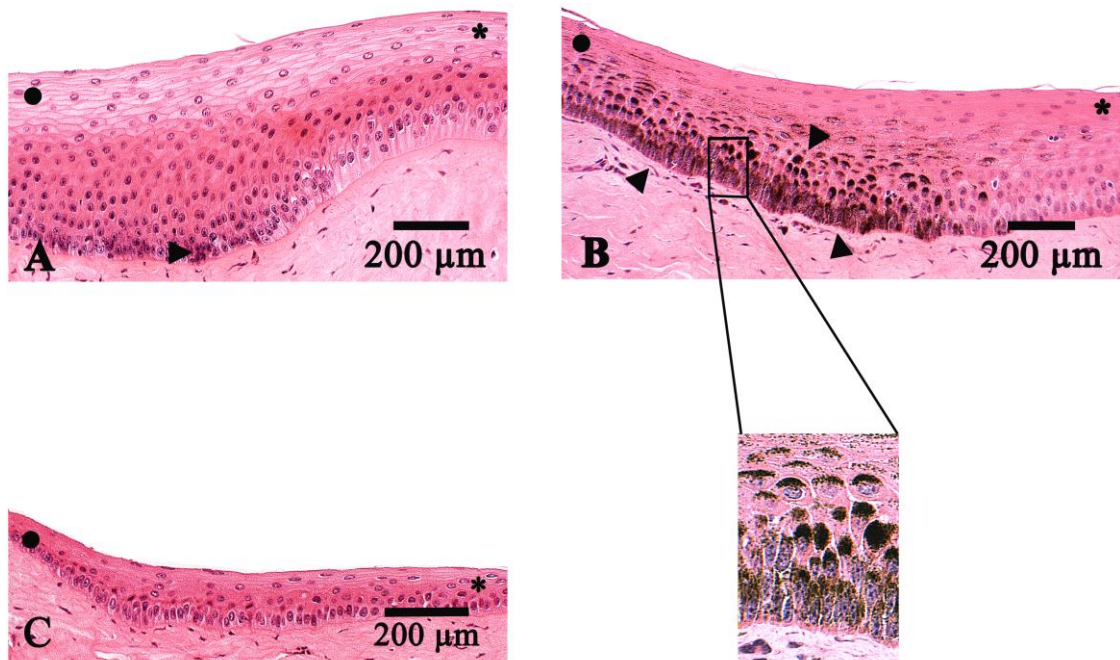
Das Zytoplasma der Intermediärzellen reduziert sich bei der Katze bereits in der basalen Intermediärzellreihe. Anschließend flachen die Zellen zunehmend ab, indem sich die anfangs runden Zellkerne horizontal abplatteten (Abb. 6). Beim Hund und den Huftieren verläuft dieser Prozess über mehrere Zelllagen, wodurch sich eine typische Flügelzellform bildet. Die triangulären Flügelzellen können bei der Ziege interdigitierende Fortsätze aufweisen (Abb. 7), die sich auch beim Pferd finden lassen. Im Gegensatz zum Schwein mit seinen stiftförmigen, länglichen Zellkernen, die sich intermediär abrunden (Abb. 7), nehmen die Zellkerne bei der Ziege, dem Rind und dem Pferd eine pleomorphe Form an (Abb. 6 und 7). Jedoch ist allen Spezies gemeinsam, dass sich die Zellkerne im *Stratum superficiale* parallel zur Hornhautoberfläche abplatteten und sich das Zytoplasma auf ein Minimum reduziert. Gleichzeitig lösen sich einzelne oberflächliche Zellen mit ihrem pyknotischen Zellkern schuppenartig vom Epithelverbund und werden in den Tränenfilm abgeschilfert. Zusammenfassend sind die Beobachtungen des vorderen Hornhautepithels in Tabelle 3 übersichtlich aufgeführt.

**Tab. 3:** Anzahl der Zelllagen im Zentrum des vorderen Hornhautepithels bei Schwein, Pferd, Rind, Ziege, Hund und Katze.

	<i>Stratum basale</i>	<i>Stratum intermedium</i>	<i>Stratum superficiale</i>
<b>Schwein</b>	<b>1</b> <b>hochprismatisch,</b> <b>überwiegend einreihig</b>	<b>5-7</b>	<b>3-4</b>
<b>Pferd</b>	<b>1</b> <b>hochprismatisch,</b> <b>einreihig</b>	<b>7-9</b>	<b>4-5</b>
<b>Rind</b>	<b>1</b> <b>hochprismatisch,</b> <b>mehrreihig</b>	<b>7-9</b>	<b>3-5</b>
<b>Ziege</b>	<b>1</b> <b>iso- bis hochprismatisch,</b> <b>überwiegend einreihig</b>	<b>4-5</b>	<b>3-4</b>
<b>Hund</b>	<b>1</b> <b>hochprismatisch,</b> <b>überwiegend einreihig</b>	<b>4-5</b>	<b>2-3</b>
<b>Katze</b>	<b>1</b> <b>isoprismatisch,</b> <b>einreihig</b>	<b>3-4</b>	<b>2</b>



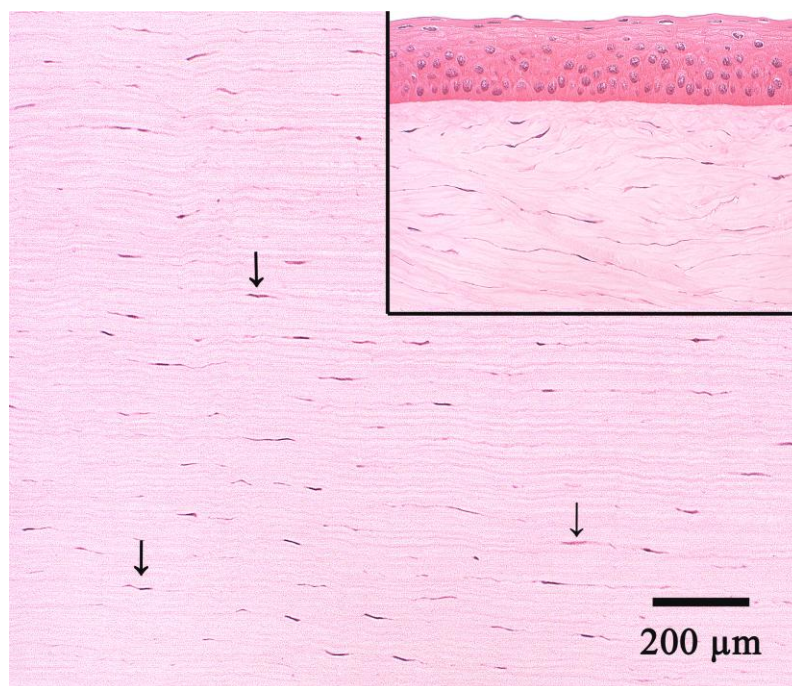
Tierartliche Unterschiede lassen sich auch in Abhängigkeit der horizontalen Lokalisation erkennen. Zwischen den zentralen, peripheren und limbalen Vermessungspunkten nimmt die Epithelhöhe tierartenübergreifend in der Tendenz erkennbar ab (Tab. A1). Am limbalen Übergang von Hornhaut- zu Konjunktivalepithel ergeben sich allerdings markante tierartliche Unterschiede (Abb. 8). Die Schichtdicke nimmt im Übergangsbereich bei den Huftieren zu, bevor sich das Hornhautepithel als deutlich reduziertes Konjunktivalepithel fortsetzt (Abb. 8A und B). Diese Transitzone weist bei den Fleischfressern lediglich eine leichte Verdichtung der basalen Zellreihe auf (Abb. 8C). Zusätzlich tritt beim Pferd, der Ziege und in geringem Maße auch beim Rind in diesem Bereich eine Pigmentierung des *Stratum basale* und *Stratum intermedium* auf (Abb. 8A und B). Bei den übrigen Tierarten kann der Grenzbereich allein über Pigmentzellen im Stroma ausgemacht werden.



**Abb. 8:** Darstellung des Limbus im Vergleich bei Rind (A), Pferd (B) und Katze (C). Die Zunahme der Schichtdicke am Übergang von Hornhautepithel (\*) zu Konjunktivalepithel (●) variiert tierartlich. Eine Pigmentierung (▶) des Hornhautepithels ist nicht bei allen untersuchten Tierarten festzustellen. Detailaufnahme: Pigmenteinlagerungen lassen sich auch noch im *Stratum intermedium* finden. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Dem vorderen Hornhautepithel folgt das Hornhautstroma, das sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung tierartenübergreifend sehr homogen zeigt. In Abbildung 9 ist das Hornhautstroma

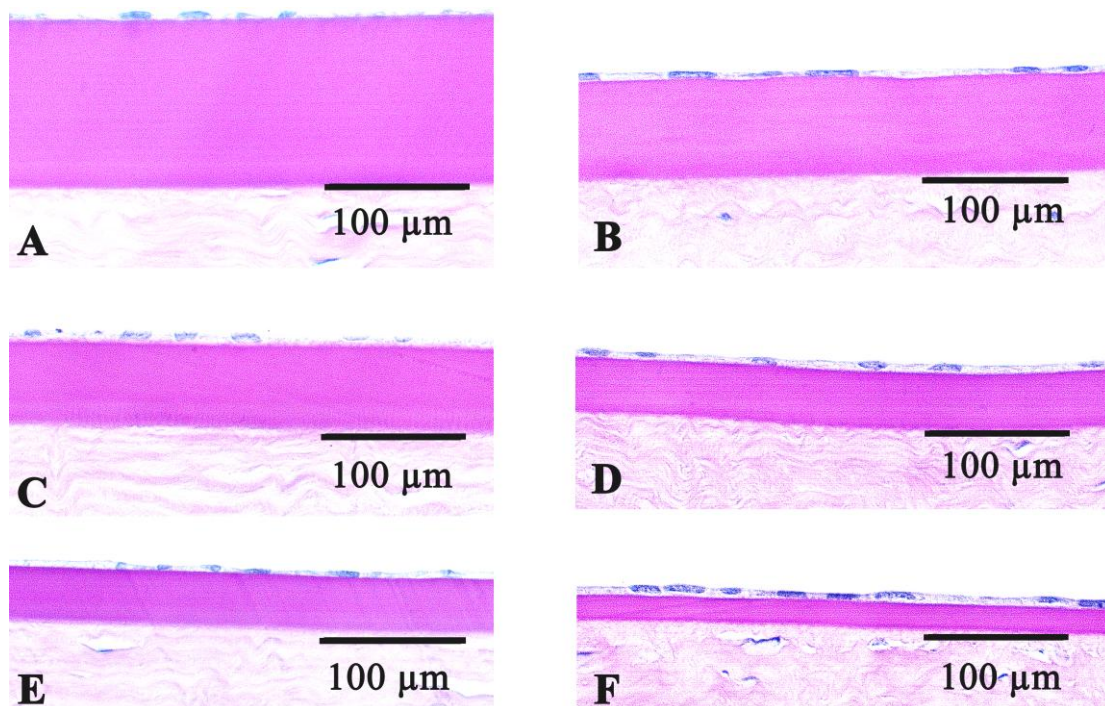
exemplarisch bei der Katze dargestellt. Die Keratozyten verlaufen als schlanke, langgestreckte Zellen mit einem flachen, spindelförmigen Kern überwiegend parallel zur Hornhautoberfläche. Sie liegen locker verteilt in einer dicht gepackten, ebenfalls parallelen Matrix aus kollagenen Fasern. Dieser hohe Ordnungsgrad findet sich jedoch noch nicht im obersten Fünftel des Stromas. Direkt unterhalb der epithelialen Basalmembran verlaufen sowohl die Keratozyten als auch die Kollagenfibrillen deutlich gewellter und weniger streng parallel (Abb. 9, Insert). Die Zelldichte der Keratozyten nimmt bei allen Tierarten zum Endothel hin geringfügig ab.



**Abb. 9:** Paralleler Verlauf der kollagenen Fasern im posterioren Anteil des Stromas einer Katze. Die schlanken Keratozyten (↑) liegen zwischen den dichtgepackten Kollagenfibrillen. Insert: Knapp unterhalb des Hornhautepithels weist der anteriore Anteil des Stromas eine deutlich geringere Ordnung auf. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.

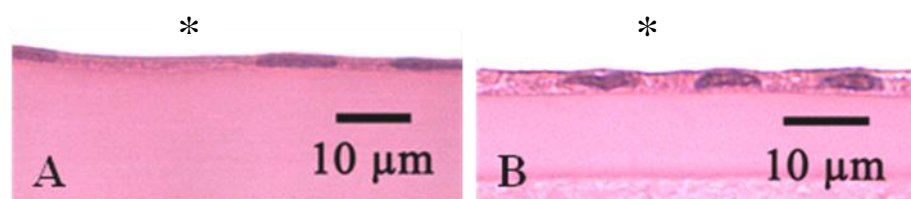
Die Schichtdicke des Stromas ist beim Rind mit durchschnittlich 2,06 mm am größten, gefolgt vom Schwein mit 1,93 mm. Im tierartlichen Vergleich besitzt das Stroma der Katze mit im Mittel 1,3 mm die geringste Höhe. Die Durchschnittshöhe beim Pferd beträgt 1,34 mm, beim Hund liegt sie mit 1,43 mm nahe derer der Ziege mit 1,42 mm (Tab. A1).

Durch eine positive PAS-Reaktion färbt sich die Descemet'sche Membran an, die unmittelbar an das posteriore Stroma grenzt. Diese magentafarbene Hornhautschicht kann speziessübergreifend scharf abgegrenzt werden, differiert jedoch deutlich in ihrer Schichthöhe, indem diese vom Pferd über das Rind, den Hund, die Ziege und die Katze bis zum Schwein hin abnimmt (Abb. 10). Die stärkste Descemet'sche Membran mit durchschnittlich 109,1  $\mu\text{m}$  kann beim Pferd gemessen werden. Sie ist annähernd doppelt so dick wie beim Rind und Hund mit einem Mittelwert von 59,1  $\mu\text{m}$  bzw. 58,2  $\mu\text{m}$ . Die Ziege weist mit einem arithmetischen Mittel von 39,4  $\mu\text{m}$  gegenüber der Katze mit einer mittleren Schichthöhe von 33,0  $\mu\text{m}$  nur eine geringe Verbreiterung der Membran auf. Beim Schwein lässt sich mit einer Durchschnittshöhe von 18,2  $\mu\text{m}$  die am geringsten ausgeprägte Descemet'sche Membran ermitteln (Tab. A1). Zum Stroma hin verdichtet sich jeweils eine dünne Grenzzone. Im Vergleich zur sonst sehr homogen gefärbten Membran stellt sich diese Linie insbesondere in der Hämatoxylin- Eosin-Färbung dunkler dar, wie bereits in Abbildung 4 (Detailaufnahme) gezeigt wurde.



**Abb. 10:** Darstellung der Descemet'schen Membran im tierartlichen Vergleich von Pferd (A), Rind (B), Hund (C), Ziege (D), Katze (E), Schwein (F). Die Schichtdicke nimmt von A nach F beträchtlich ab. PAS-Reaktion.

Das hintere Hornhautepithel besteht bei allen Spezies aus einer einschichtigen Zellschicht. Dieses Plattenepithel bildet die Grenze zur vorderen Augenkammer und schließt sich der Descemetischen Membran an. Die Zellen breiten sich flächenhaft aus und nehmen eine sehr flache Gestalt an (Abb. 11). Eine Ausnahme bildet dabei das Schwein, das ein etwas höheres Endothel aufweist, wobei auch hier noch keine isoprismatische Zellform erreicht wird (Abb. 11B). Bei den Wiederkäuern erscheinen die längsovalen Zellkerne stark abgeplattet (Abb. 11A). Beim Schwein, Pferd und den Fleischfressern besitzt der Kern hingegen eine zur vorderen Augenkammer leicht konvexe, bohnenähnliche Form (Abb. 11B).



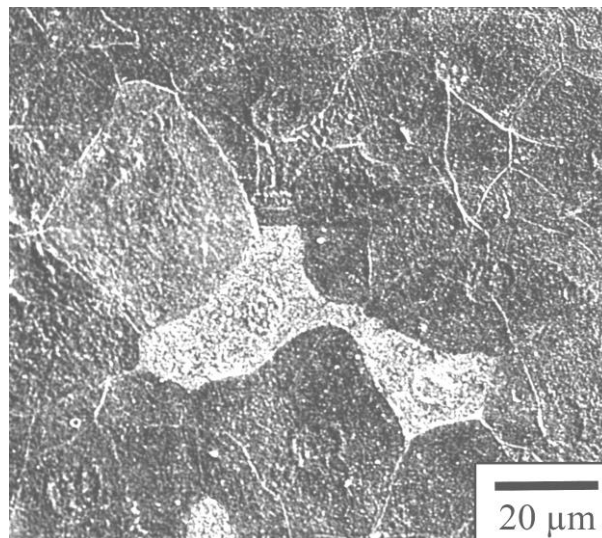
**Abb. 11:** Ausschnitt aus dem Endothel von Ziege (A) und Schwein (B). Das Schwein mit seinen etwas höheren Endothelzellen weist Zellkerne mit einer zur vorderen Augenkammer (\*) hin leicht konvexen Form auf. Bei der Ziege stellen sich die Zellkerne abgeplattet dar. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Blutgefäße sind ausschließlich im Randbereich der untersuchten Proben zu finden. So sind wenige *Arteriolen* und *Venolen* sowie feinste Kapillaren sowohl in der Konjunktiva als auch in der Sklera anzutreffen.



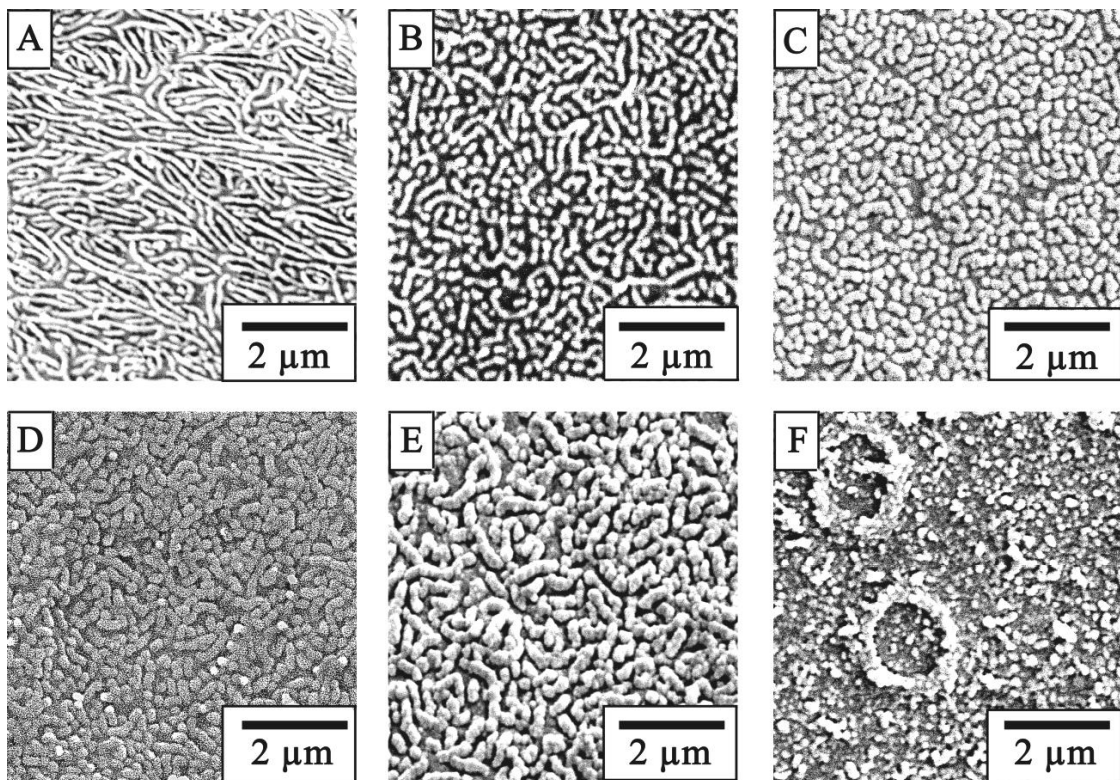
## 4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Das vordere Hornhautepithel bildet eine plane Oberfläche aus flachen, polygonal geformten Zellen. Bei den Fleischfressern wirken die Zellen etwas abgerundeter als beim Schwein und den Pflanzenfressern. Im Allgemeinen besitzen die Zellen lange, gerade Zellgrenzen. Die Epithelzellen erscheinen jeweils zentral etwas kleiner als zur Peripherie hin, weshalb eine höhere zentrale Zelldichte vermutet werden kann. Bei allen Spezies sind in der Regel die Zellkerne gut zu erkennen, wobei sie sich insbesondere beim Schwein plastisch vorwölben. Durch die unterschiedlichen Altersstufen der sich stetig ablösenden, oberflächlichen Zellen erhält das Epithel ein mosaikartiges Erscheinungsbild (Abb. 12). Dies lässt sich bei allen untersuchten Tierarten feststellen. Vereinzelt sind Zellen zu erkennen, die im Begriff sind sich vom Epithelverband zu lösen. Diese Zellen sind deutlich dunkler und stellen sich in ihrer gesamten Größe dar, wohingegen die helleren Zellen teils großzügig verdeckt werden, da sie sich noch in einer der unteren Ebenen befinden.



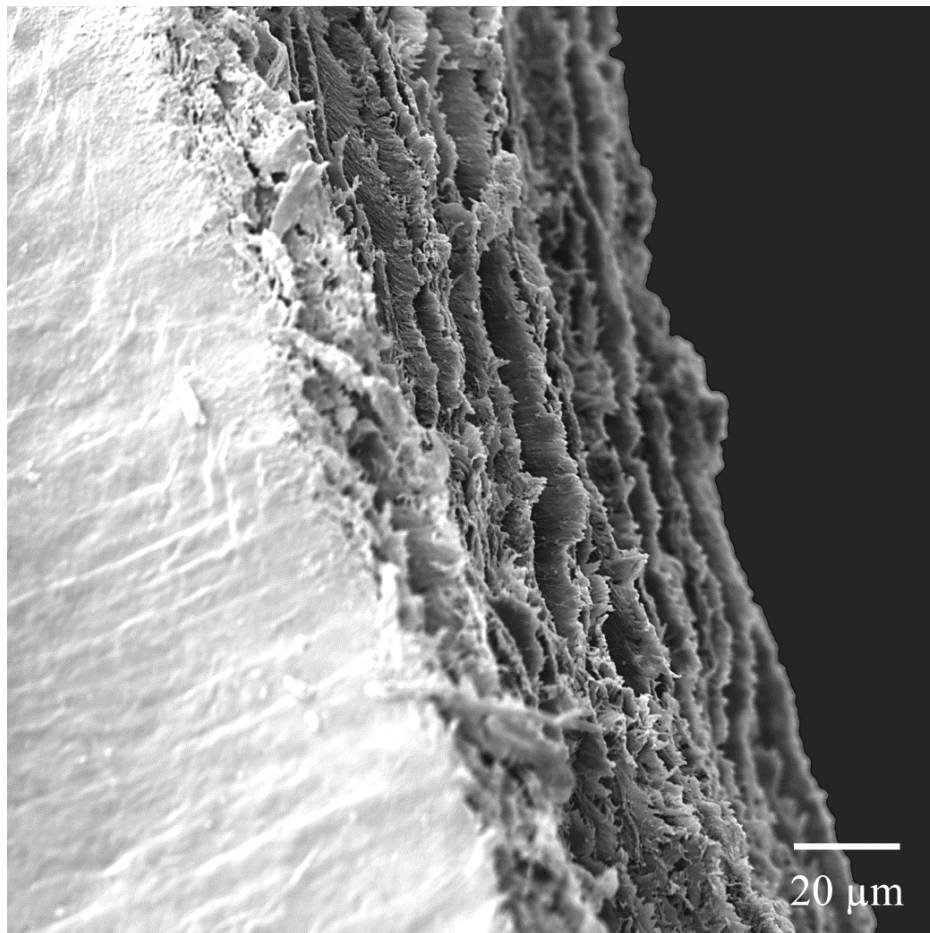
**Abb. 12:** Hornhautepithel vom Schwein. Zu sehen sind mosaikartig angeordnete, polygonale Epithelzellen des *Stratum superficiale*. Durch unterschiedliche Elektronenreflexe erscheinen die Zellen in verschiedenen Graustufen. REM-Aufnahme.

Bei näherer rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung weisen die Epithelzellen eine tierartlich unterschiedliche Oberflächenstruktur bestehend aus *Microvilli* und *Microplicae* auf (Abb. 13). Je dunkler eine Zelle erscheint, desto geringer sind die Zellausstülpungen ausgeprägt. Beim Schwein bedecken zahlreiche *Microplicae* die Zelloberfläche. Diese Falten sind überwiegend langgestreckt und von schmaler, flacher Gestalt (Abb. 13A). Bei den Fleischfressern handelt es sich hauptsächlich um kurze, zum Teil gewundene *Microvilli* (Abb. 13B und C). Im Vergleich zum Schwein und der Katze wirken die Membranausstülpungen beim Hund deutlich erhabener. Auch das Rind und das Pferd lassen plastisch wirkende *Microplicae* erkennen, wobei sie sich beim Pferd im Vergleich zum Rind und Hund schmaler darstellen (Abb. 13D und E). Eine Besonderheit liegt bei der Ziege vor. Hier lassen sich neben kurzen *Microvilli* einzelne, locker verstreute, ringförmige Ausstülpungen antreffen (Abb. 13F). Diese Kringel kommen tendenziell in der Peripherie häufiger vor als im Zentrum.



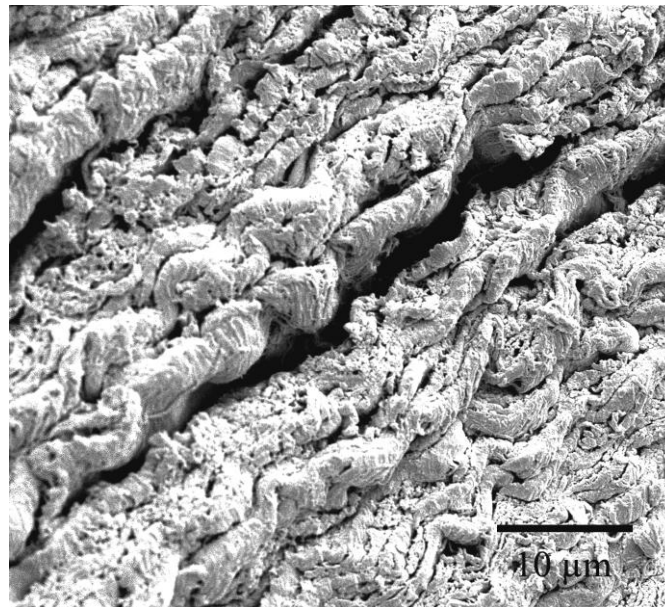
**Abb. 13:** Die Epitheloberfläche besitzt multiple Membranausstülpungen (*Microvilli* und *Microplicae*), die mit dem Tränenfilm in Kontakt stehen. Beim Schwein (A) sind die Ausstülpungen langgezogen, bei der Katze (B) und beim Hund (C) kurz und gewunden. Das Pferd (D) weist wie das Rind (E) sichtlich höhere Oberflächenvergrößerungen auf. Bei der Ziege (F) lassen sich kreisrunde erhabene Kringel finden. REM-Aufnahme.

Eine Bowmansche Membran konnte wie in der histologischen Untersuchung unter dem Rasterelektronenmikroskop bei keiner untersuchten Spezies differenziert werden. Das Stroma der Hornhaut kann besonders gut an einer Bruchkante begutachtet werden. Die lamellenartige Anordnung der Kollagenfibrillen gestaltet sich bei den analysierten Tierarten morphologisch ähnlich wie beim Rind (Abb. 14). Zahlreiche Schichten liegen dichtgepackt untereinander und erscheinen parallel angeordnet. Analog zu den histologisch ermittelten stromalen Schichtdicken unterscheidet sich im tierartlichen Vergleich auch die Anzahl der Lagen unter dem Rasterelektronenmikroskop. Die einzelnen Lagen lassen hingegen tierartlichvergleichend keinen nennenswerten Unterschied erkennen. Immer wieder sind Verflechtungen zwischen den einzelnen Kollagenlagen zu erkennen, wodurch ein stabiles Netz gebildet wird.



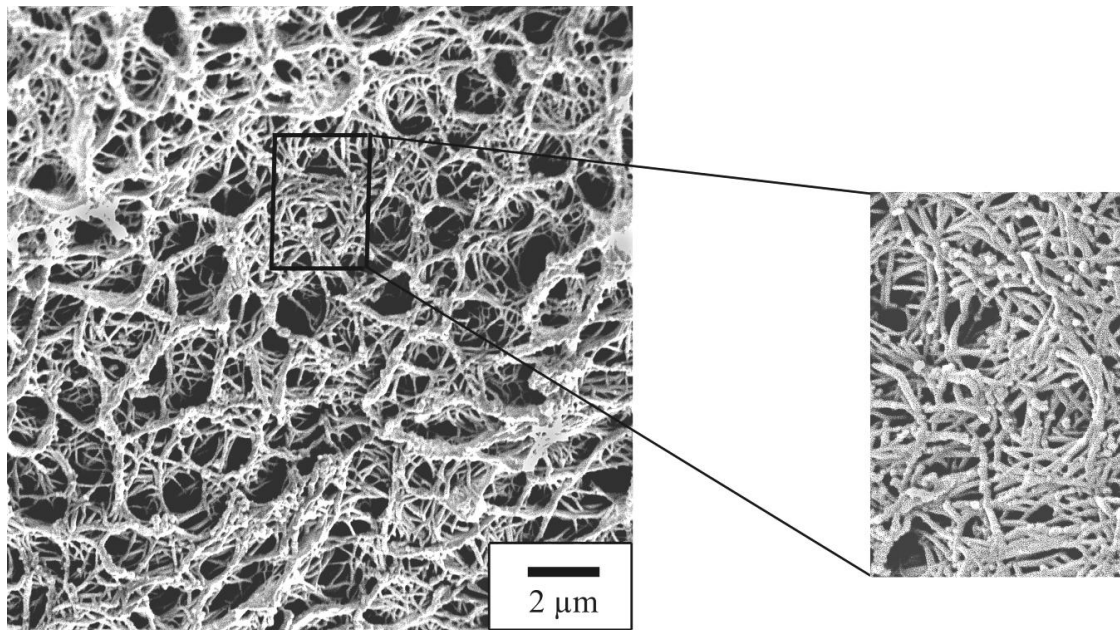
**Abb. 14:** Gefrierbruch der Hornhaut mit Aufsicht auf die endotheliale Oberfläche vom Rind. Die parallele, lamelläre Schichtung des Stromas ist gut zu erkennen. REM-Aufnahme.

Durch Mazeration konnte der parallele, längsgerichtete Verlauf der kollagenen Fasern dargestellt werden (Abb. 15). Die einzelnen Fasern organisieren sich zu Primärbündel und verlaufen darin streng parallel. Eine Verzweigung wie zwischen den Kollagenlamellen kann innerhalb der Primärbündel nicht festgestellt werden. Zudem war es nicht möglich, einzelne Keratozyten, die innerhalb der Lamellen liegen, abzugrenzen, um sie genauer rasterelektronenmikroskopisch zu evaluieren.



**Abb. 15:** Längsgerichteter Verlauf der kollagenen, lamellenbildenden Faserbündel im Stroma beim Schwein. Mazeration. REM-Aufnahme.

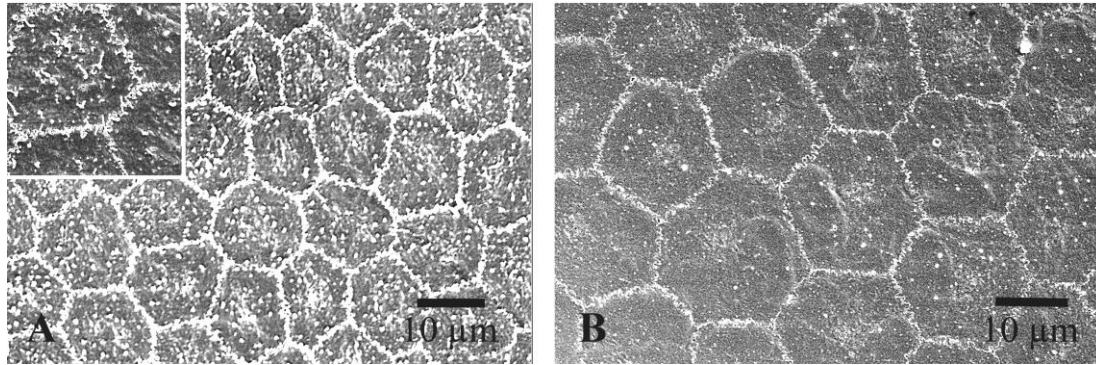
Beim Pferd und beim Rind konnte mittels der Mazeration die Descemetsche Membran sichtbar gemacht werden. Bei den übrigen Tierarten war dies teils auch aufgrund des limitierten Probenmaterials nicht möglich. Die Descemetsche Membran des Rindes weist ein strukturiert wirkendes Netzwerk aus annähernd hexagonalen Maschen auf, das aus Kollagenfasern besteht (Abb. 16). Zwischen dem Grundgerüst winden sich zahlreiche, feine kollagene Fasern (Detailaufnahme). Beim Pferd verdichten sich diese Fasern, sodass die Gitterstruktur an Übersichtlichkeit verliert und der hexagonale Charakter des Grundgerüsts etwas weniger deutlich wird (nicht dargestellt).



**Abb. 16:** Darstellung der Descemet'schen Membran mit der hexagonalen Gitterstruktur beim Rind. Detailaufnahme: Kollagene Fasern verlaufen zwischen dem Gittergerüst. Mazeration. REM-Aufnahme.

Das Endothel aller untersuchten Haussäugetiere weist insbesondere in der hexagonalen Grundform der Endothelzellen große Gemeinsamkeiten auf (Abb. 17). Nur vereinzelte Zellen weichen davon ab und bilden irregulär abgerundete Zellgrenzen. Diese rundlichen Zellen bilden meist einen Mittelpunkt, um den sich fünf bis sieben hexagonale Zellen blütenförmig anordnen. Es entsteht ein netzartiges Muster, das sich gleichmäßig über das gesamte Endothel erstreckt. Ein morphologischer Unterschied zwischen Zentrum und Peripherie ist dabei nicht festzustellen. Auffällig jedoch ist der Größenunterschied der Endothelzellen zwischen den Tierarten, aber auch innerhalb einer Tierart unter Berücksichtigung des Alters. So kann beim Schwein beobachtet werden, dass sich die Zellen im Alter zwischen 0,5 - 3 Jahren vergrößern, aber nichts an ihrer regelmäßigen Hexagonalität verlieren. Im Vergleich zum Endothel beim Hund sind die Zellen jedoch in einem Alter von jeweils > 2 Jahren deutlich kleiner entwickelt (Abb. 17A). Bei detaillierter Betrachtung unter dem Rasterelektronenmikroskop lassen sich *Microvilli* auf der Zelloberfläche identifizieren (Abb. 17A, Insert). Besonders viele dieser Oberflächenausstülpungen liegen ebenso beim Rind vor. Dadurch erscheinen die Zellen rau, wohingegen die Oberfläche der Fleischfresser deutlich glatter wirkt. Hund und Katze besitzen im Vergleich zu den übrigen untersuchten Tierarten nur vereinzelte *Microvilli* (Abb. 17B).

Zusätzlich zu den Membranausstülpungen weisen die Grenzbereiche eine Besonderheit auf. Die klar erkennbaren Zellgrenzen erscheinen erhaben und besitzen eine gewundene Grenzlinie. Eine Verzahnung zweier aneinandergrenzenden Zellen ist bei allen Tierarten zu erkennen (Abb. 17A, Insert).



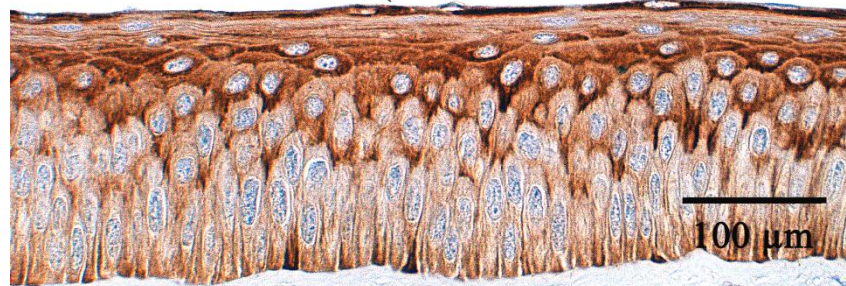
**Abb. 17:** Die hexagonalen Endothelzellen sind netzartig angeordnet. Beim Schwein (A) sind die Zellen erkennbar kleiner als beim Hund (B) ausgebildet (jeweils > 2 Jahre), tragen hingegen vermehrt feine *Microvilli*. Insert: Detailansicht der *Microvilli* und der verzahnten Zellgrenzen.

## 4.3 Immunhistochemie

### 4.3.1 Cytokeratine

#### Cytokeratin 1 (CK1)

Bei allen untersuchten Tierarten ist eine moderate bis starke Expression von CK1 im Zytoplasma der Hornhautepithelzellen wahrzunehmen. Das Endothel zeigt hingegen keine positive Reaktion und verhält sich somit wie das korneale Stroma. Im Epithel zeigen sich wie folgt tierartliche Unterschiede. Beim Schwein und bei den Wiederkäuern reagiert der monoklonale Antikörper gegen CK1 insbesondere im *Stratum superficiale* und im apikalen Drittel der Flügelzellschicht (Abb. 18). Dabei nimmt die Farbintensität zu den darunter gelegenen Zellschichten hin ab.



**Abb. 18:** Verteilung von Cytokeratin 1 im zentralen Hornhautepithel des Schweines. Das Zytoplasma der anterioren Intermediär- und Oberflächenzellen ist deutlich markiert. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalaun.

Darüber hinaus färbt sich bei den Wiederkäuern das Zytoplasma in der basalen Zellreihe subnuklear moderat an (Tab. 4). Die Katze und der Hund besitzen ein intensiv tingiertes *Stratum superficiale* und *Stratum intermedium*. Hier ist das gesamte Zytoplasma braun gefärbt (Tab. 4). Das *Stratum basale* erscheint währenddessen erkennbar heller und färbt sich zusätzlich eher im subnuklearen Bereich an. Beim Pferd ist die Expression besonders im *Stratum superficiale* stark ausgeprägt und verliert im *Stratum intermedium* und *Stratum basale* an Intensität (Tab. 4).

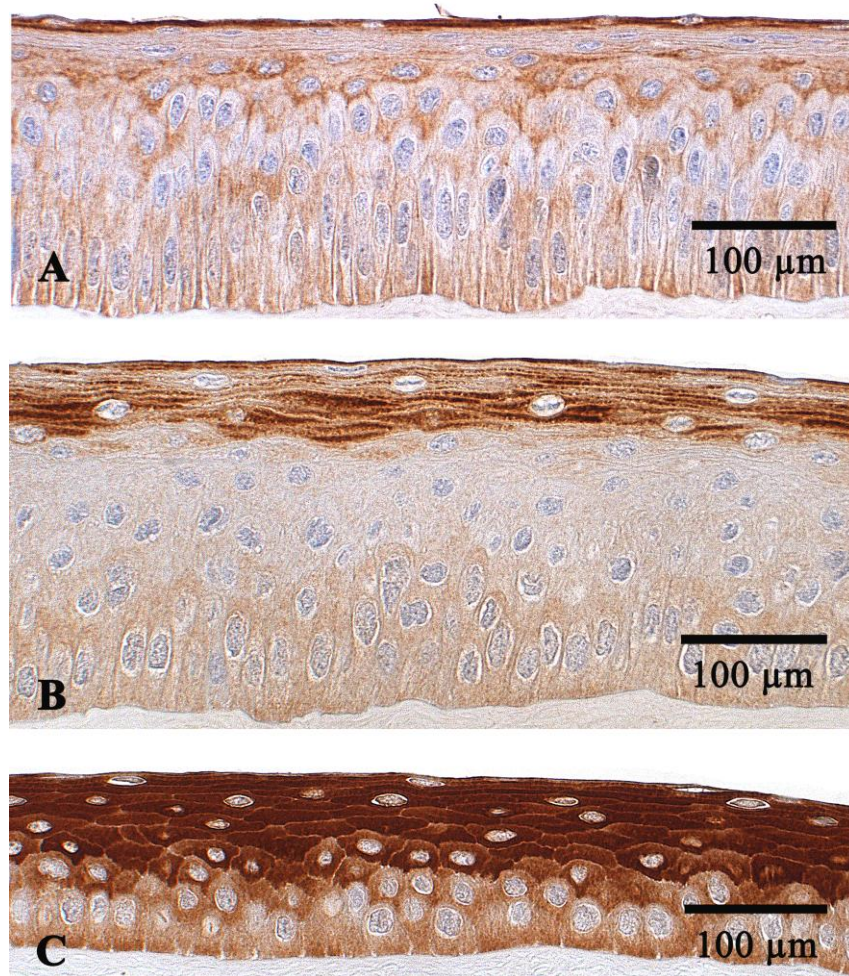
**Tab. 4:** Übersicht der Expression von CK1 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).

	<i>Stratum basale</i>	<i>Stratum intermedium</i>	<i>Stratum superficiale</i>
<b>Schwein</b>	+/-	+	++
<b>Pferd</b>	++	++	+++
<b>Rind</b>	+	+/-	++
<b>Ziege</b>	+	+	++
<b>Hund</b>	++	+++	+++
<b>Katze</b>	++	+++	+++

### Cytokeratin 2 (CK2)

CK2 lässt sich in der Hornhaut bei allen sechs analysierten Spezies mittels eines polyklonalen Antikörpers nachweisen. Jedoch beschränkt sich die Expression auf das vordere Hornhautepithel und unterscheidet sich tierartlich (Abb. 19, Tab. A2). Im Stroma und im Endothel ist keine Reaktion zu beobachten. Das *Stratum superficiale* färbt sich bei allen Tierarten positiv an, wobei das Epithel des Schweins allein in der obersten Zellschicht entsprechend reagiert (Abb. 19A). Die Ziege, das Rind und das Pferd exprimieren das CK2 in der gesamten Oberflächenschicht mit moderater Intensität (Abb. 19B). Das *Stratum intermedium* wird bei diesen Tierarten nicht markiert, während sich beim Rind das *Stratum basale* erneut moderat anfärbt. Das Epithel der Fleischfresser zeigt bis auf das *Stratum basale* eine starke Braunfärbung, die erst ab der untersten Flügelzellschicht heller wird (Abb. 19C).





**Abb. 19:** Expressionsmuster von Cytokeratin 2 im vorderen Hornhautepithel. Beim Schwein (A) beschränkt sich die Expression auf die oberflächlichste Zellschicht des *Stratum superficiale*, welches sich bei der Ziege (B) komplett moderat anfärbt. Im Vergleich dazu wird bei der Katze (C) sowohl das *Stratum superficiale* als auch das *Stratum intermedium* intensiv markiert. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalaun.

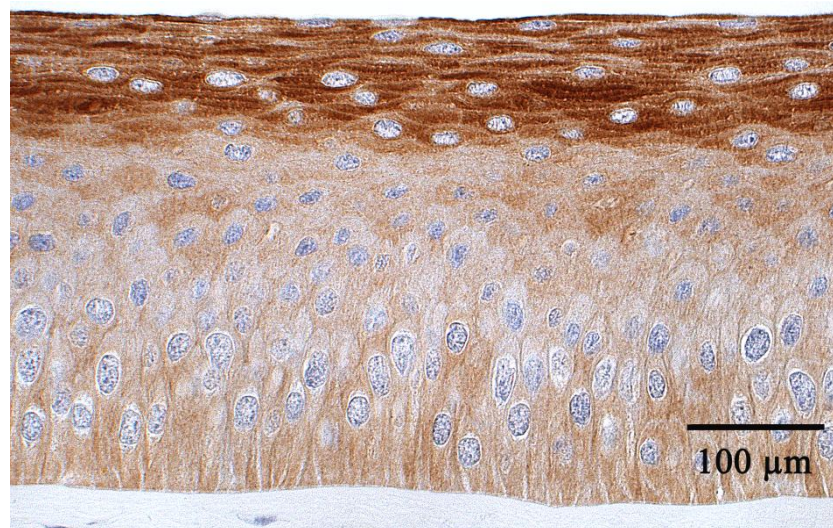
### Cytokeratin 3 (CK3)

Der monoklonale Antikörper CK3/2p detektiert im kornealen Epithel CK3. In anderen Schichten der Hornhaut ist CK3 nicht nachweisbar. Wie schon bei den Cytokeratinen 1 und 2 ergibt sich ein tierartenunterschiedliches Expressionsmuster innerhalb des vorderen Hornhautepithels (Tab. 5). Beim Pferd findet man die geringste Expression. Sie beschränkt sich auf die äußerste Zellschicht des *Stratum superficiale*, die schwach bis moderat gefärbt wird. Auch beim Hund lässt sich nur eine schwache Expression im gesamten *Stratum*

*superficiale* feststellen. Die Expression steigt von moderat beim Schwein auf deutlich bei den Wiederkäuern an (Tab. 5). Zusätzlich weist das Rind noch eine leichte Färbung der zwei weiteren *Strata* des Hornhautepithels auf (Abb. 20). Bei der Katze ist die stärkste Expression zu beobachten. Neben dem *Stratum superficiale* reagiert auch noch das *Stratum intermedium* intensiv braun (Tab. 5).

**Tab. 5:** Übersicht der Expression von CK3 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).

	<i>Stratum basale</i>	<i>Stratum intermedium</i>	<i>Stratum superficiale</i>
<b>Schwein</b>	-	-	+
<b>Pferd</b>	-	-	+/-
<b>Rind</b>	+/-	+/-	++
<b>Ziege</b>	-	-	++
<b>Hund</b>	-	-	+/-
<b>Katze</b>	+	+++	+++



**Abb. 20:** Das *Stratum superficiale* des zentralen Hornhautepithels reagiert beim Rind deutlich positiv auf den immunhistochemischen Nachweis von Cytokeratin 3. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.

### 4.3.2 p63

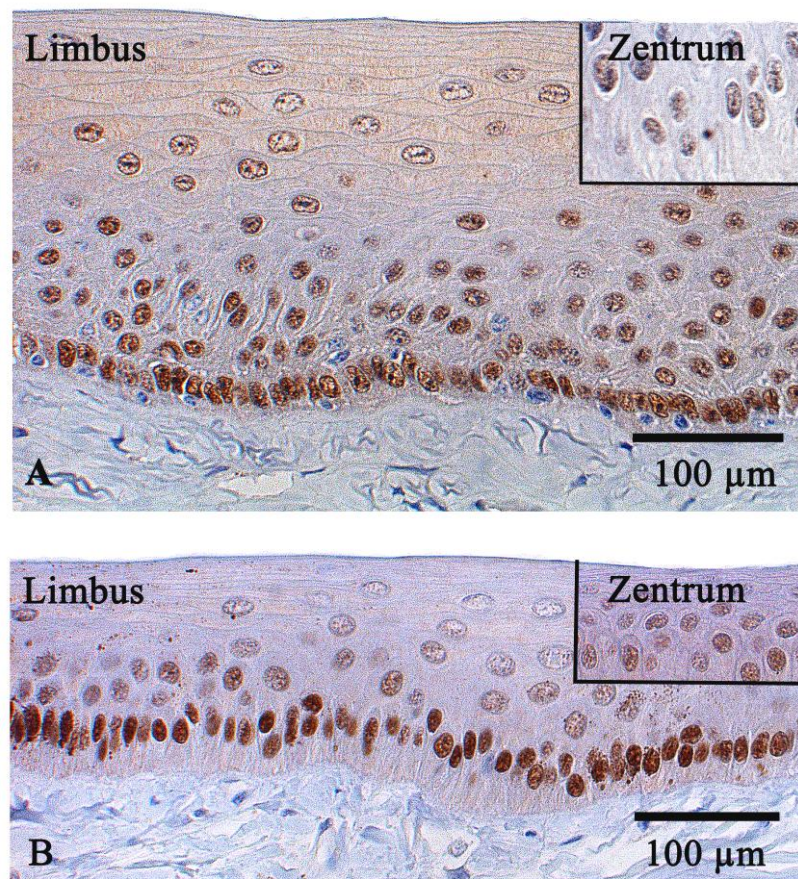
Der monoklonale Antikörper Y4A3 markiert den Transkriptionsfaktor p63 im Zellkern von Vorläuferzellen und kann daher als Stammzellmarker verwendet werden. Bei allen untersuchten Spezies sind p63-positive Zellkerne im vorderen Hornhautepithel nachweisbar. Bei der Betrachtung des Epithels entlang der limbalen zur zentralen Zone zeigt der Limbus bei nahezu allen untersuchten Tierarten (Ausnahme Ziege) die stärkste Intensität von p63 (Tab. 6). Dabei reagiert hauptsächlich das *Stratum basale* intranuklear deutlich bis stark positiv (Abb. 21). Beim Rind und Schwein, sowie im geringen Umfang auch beim Pferd, werden limbal zusätzlich Kerne detektiert, die sich im *Stratum intermedium* befinden (Abb. 21A). Zum Zentrum hin sinkt bei jenen die Anzahl und Intensität der positiven Zellkernreaktionen (Tab. 6).

**Tab. 6:** Übersicht der Expression von p63 in den einzelnen Abschnitten der Hornhaut. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).

	Limbus	Peripherie	Zentrum
<b>Schwein</b>	++	+	+
<b>Pferd</b>	++	+/-	+/-
<b>Rind</b>	++	+	+/-
<b>Ziege</b>	+/-	--	--
<b>Hund</b>	+++	++	++
<b>Katze</b>	+++	++	++

Bei der Ziege reagiert das Epithel am geringsten und ist in der Peripherie und im Zentrum sogar p63-negativ (Tab. 6). Allein bei den Fleischfressern ist über die gesamte basale Epithelzellreihe eine deutliche Braunfärbung zu erkennen (Abb. 21B). Die Katze weist außerdem peripher wie zentral im *Stratum intermedium* p63-positive Zellen auf. Beim Hund ist dies nur teilweise im Zentrum des Epithels der Fall (Abb. 21B).



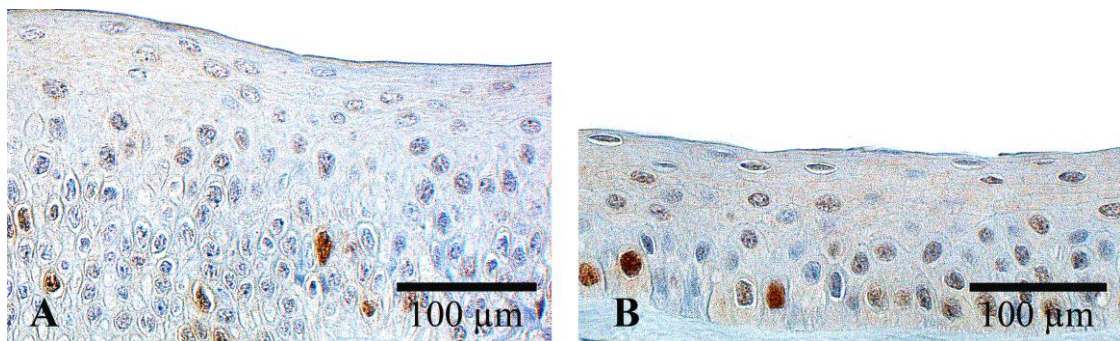


**Abb. 21:** Expression von p63 im Limbus beim Rind (A) und Hund (B). Die Expression beschränkt sich beim Rind nicht nur auf das *Stratum basale*. Insert: Zentral der Hornhaut ist die Intensität der DAB-Reaktion erkennbar geringer. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalaun.

### 4.3.3 Mitosemarker (PCNA und PHH3)

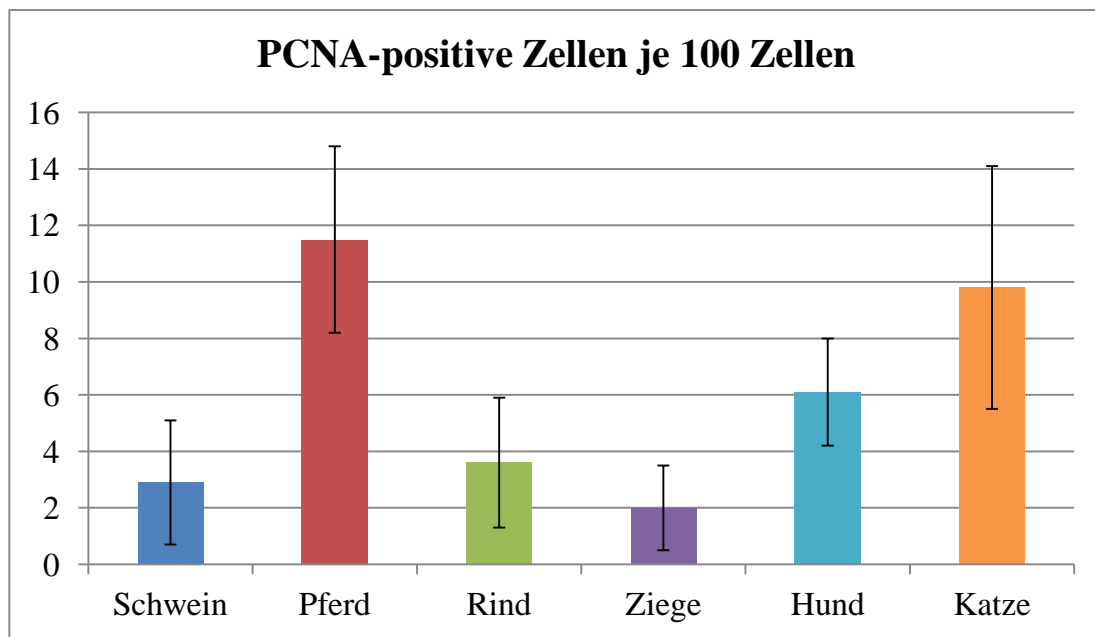
Der Nachweis proliferierender Zellen in der Hornhaut wird mit Hilfe von zwei Proliferationsmarkern geführt. Die Zellkernproteine PCNA und PHH3 dienen der Identifizierung mitotisch aktiver Zellen.

In der Hornhaut kommen diese Mitosezellen bei PCNA überwiegend im *Stratum basale* des vorderen Hornhautepithels vor (Abb. 22).



**Abb. 22:** Unterschiedlich starke Expression von mitotisch aktiven, PCNA-positiven Basalzellen des peripheren Hornhautepithels von Schwein (A) und Hund (B).

Die Anzahl der teilungsaktiven Basalzellen variierte sowohl tierartlich als auch in Abhängigkeit von der Lokalisation entlang der basalen Zelllage. Es wurden limbal, peripher und zentral Mitosestadien ausgezählt und daraus der Durchschnittswert mit Standardabweichung gebildet. Die meisten Mitosen kann man beim Pferd nachweisen (Abb. 23). Sie befinden sich hauptsächlich im Limbus und nehmen zum Zentrum hin ab. Etwas seltener findet man PCNA-positive Zellen bei der Katze (Abb. 23). Beim Hund bilden sich zentral wenige kleine Gruppen von zwei bis drei PCNA-positiven Zellen, die nahe beieinander liegen. Die geringste epitheliale Teilungsfähigkeit liegt bei Schwein und Ziege vor (Abb. 23). Im Endothel können nur äußerst vereinzelt beim Schwein und der Katze schwach markierte, teilungsaktive Zellen ermittelt werden. Sie sind im Bereich des Limbus anzutreffen. Das Stroma weist keine Reaktion auf.



**Abb. 23:** Anzahl der PCNA-positiven, epithelialen Basalzellen, ermittelt aus limbalen, peripheren und zentralen Messpunkten. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

PHH3 markiert im Gegensatz dazu ausschließlich das kondensierte Chromatin im *Stratum basale* des Hornhautepithels. Bei Herbi- und Omnivoren werden vereinzelte Zellkerne erkennbar braun markiert (Abb. 24), wohingegen sich die Kernfärbung bei den Fleischfressern deutlich heller darstellt. Zur Auswertung von PHH3 wurden analog zu PCNA die markierten Mitosezellen ausgezählt. Durchschnittlich finden sich bei den Großtieren ein bis zwei teilungsaktive Zellen je 100 basaler Hornhautepithelzellen, bei den Kleintieren sind es maximal eine Zelle (Tab. A4).



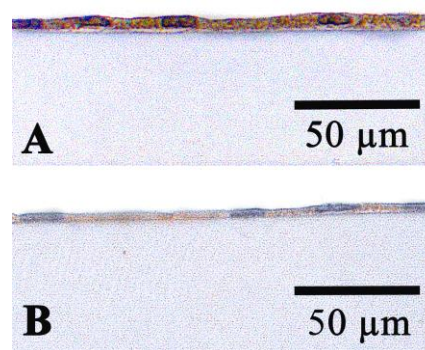
**Abb. 24:** PHH3-positive Zelle zum Zeitpunkt der Mitose im peripheren Bereich der Hornhaut der Ziege. Typisch ist die Färbung des kondensierten Chromatins sowie die Lokalisation im *Stratum basale*. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalun.

#### 4.3.4 Claudin-1

Das Zellverbindungsprotein Claudin-1 lässt sich mit einem polyklonalen Antikörper in der Hornhaut aller getesteten Tierarten nachweisen. Das Verteilungsmuster stellt sich allerdings zum Teil erkennbar unterschiedlich dar. Im Endothel kann bei allen sechs Spezies ein positiver DAB-Farbumschlag festgestellt werden. Das Zytoplasma von Katze, Schwein und Wiederkäuern (Abb. 25A) färbt sich im Vergleich zu dem von Pferd und Hund deutlicher an (Abb. 25B). Letztere besitzen nur eine schwache Zytoplasmafärbung.

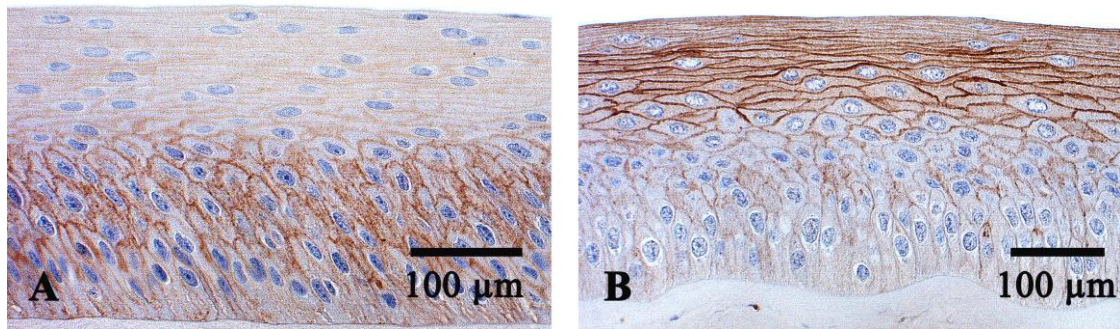
**Abb. 25:**

Tierartlich unterschiedliche Intensität der DAB-Reaktion bei Claudin-1 im Zytoplasma des Endothels, Rind (A) und Pferd (B). DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.



Verglichen mit dem recht einheitlich gefärbten Endothel kommen im Epithel deutlichere Unterschiede zum Vorschein. Epithelial wird insbesondere die Zellmembran positiv markiert. Bei den Wiederkäuern, dem Schwein und der Katze markiert sich die Zellmembran vor allem im *Stratum superficiale* und *Stratum intermedium* intensiv. Die Zellgrenzen des *Stratum intermedium* reagieren beim Rind jedoch nicht komplett positiv, sondern schwächen sich in der unteren Hälfte zunehmend ab und erscheinen in der apikalen Zellmembran deutlicher koloriert (Abb. 26A). Das Pferd besitzt im Vergleich dazu ein außergewöhnliches Expressionsmuster. Bei dieser Tierart färbt sich die Zellmembran in erster Linie im posterioren Anteil des *Stratum intermedium* an (Abb. 26B). Die jeweilige speziesspezifische Claudin-1-Musterung stellt sich entlang der kornealen Abschnitte identisch dar.





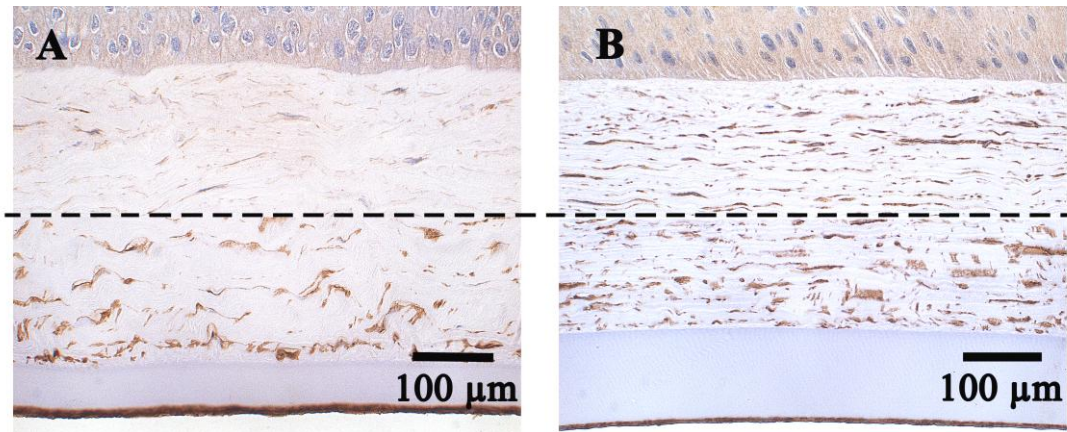
**Abb. 26:** Unterschiedliche Verteilung von Claudin-1 im Hornhautepithel. Beim Pferd (**A**) liegt die Expression hauptsächlich im *Stratum intermedium*. Die Lokalisation von Claudin-1 ist beim Rind (**B**) vermehrt im apikalen *Stratum intermedium* und *Stratum superficiale*. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalaun.

### 4.3.5 Aquaporine

#### Aquaporin 1 (AQP1)

Das hintere Hornhautepithel wird durch immunhistochemische Untersuchungen bei allen getesteten Tierarten mit einem polyklonalen Antikörper gegen das integrale Membranprotein AQP1 stark markiert. Diese intensive Reaktion findet sich tierartenübergreifend entlang des gesamten Endothels. Desweiteren werden, exklusive der Wiederkäuer, auch viele Keratozyten des hinteren Stromas AQP1-positiv markiert (Abb. 27). Bei den Wiederkäuern liegen wenige AQP1-positive Reaktionen vor. Dabei färben sich die langgestreckten Keratozyten bis in ihre sich verjüngenden, plasmazytären Ausläufer. Im Vergleich zu den anderen Haussäugetieren reagieren die Keratozyten beim Pferd im gesamten Stroma deutlich positiv (Abb. 27B). Im Gegensatz dazu nimmt bei den Wiederkäuern und dem Schwein die Häufigkeit der Farbreaktion zum Epithel hin deutlich ab (Abb. 27A). Beim Schwein verdichtet sich knapp unterhalb des Epithels eine AQP1-positive Lage von Keratozyten.





**Abb. 27:** Immunhistochemischer Nachweis von AQP1. Die Keratozyten exprimieren bei der Ziege (A) AQP1 im posterioren Anteil des Hornhautstromas. Beim Pferd (B) werden die Keratozyten im gesamten Stroma angefärbt. Das Endothel weist sowohl bei der Ziege als auch beim Pferd eine deutlich positive Reaktion auf. Das Stroma wurde zur vergleichenden Darstellung verkleinert (- - -). DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.

Ein etwas anderes Bild zeichnet sich beim Fleischfresser ab. Hier reduziert sich die Farbreaktion im zentralen Stroma auf einzelne Keratozyten. Im anterioren Bereich des Stromas steigt daraufhin bei Hund und Katze die Anzahl der positiven Reaktionen wieder deutlich an (Tab. 7). Im Epithel lässt sich bei keiner untersuchten Tierart eine Expression von AQP1 feststellen.

**Tab. 7:** Tierartlicher Vergleich der Expression von AQP1 in den einzelnen Schichten der Hornhaut. Dargestellt ist die Anzahl der positiv markierten Zellen (-- keine, +/- einzelne (< 10 %), + wenige (< 50 %), ++ (viele < 80 %), +++ zahlreiche (>80 %)).

	Epithel	Stroma anterior	Stroma zentral	Stroma posterior	Endothel
Schwein	--	+/-	+	++	+++
Pferd	--	++	++	++	+++
Rind	--	+/-	+	+	+++
Ziege	--	+/-	+/-	+	+++
Hund	--	+++	+/-	++	+++
Katze	--	++	+/-	++	+++

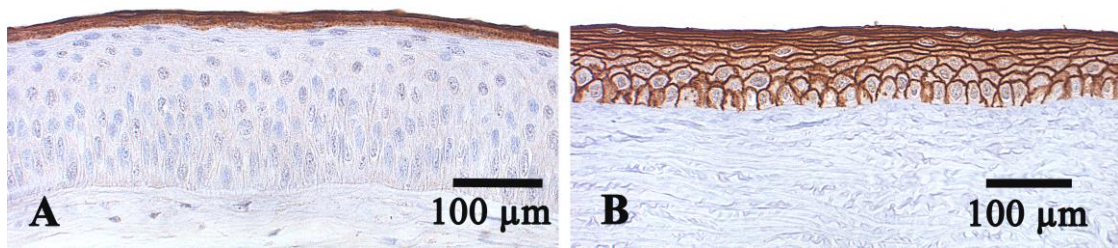
### Aquaporin 5 (AQP5)

Mit einem monoklonalen Antikörper gegen AQP5 kann die Lokalisation dieses Membranproteins in der Hornhaut nachgewiesen werden. Entgegen der Expression von AQP1, das sich im Endothel und Stroma auffinden lässt, kommt AQP5 ausschließlich im vorderen Hornhautepithel vor. Das Protein verteilt sich vom Limbus bis zum Zentrum innerhalb der Tierart gleichmäßig, variiert allerdings zwischen den einzelnen Spezies innerhalb der Epithelschichten erheblich (Tab. 8).

**Tab. 8:** Übersicht der Expression von AQP5 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).

	<i>Stratum basale</i>	<i>Stratum intermedium</i>	<i>Stratum superficiale</i>
<b>Schwein</b>	--	--	++
<b>Pferd</b>	--	+	+++
<b>Rind</b>	+/-	++	+++
<b>Ziege</b>	--	+/-	++
<b>Hund</b>	+/-	+	+++
<b>Katze</b>	++	++	+++

Beim Schwein wird allein die oberflächlichste Schicht des *Stratum superficiale* positiv markiert (Abb.28 A). Im Vergleich dazu reagiert beim Pferd und dem Rind das gesamte *Stratum superficiale* sowie die zwei bis drei anterioren Zelllagen des *Stratum intermedium* positiv (Tab. 8). Im *Stratum superficiale* färbt sich die Zellmembran der gesamten Zelle, wohingegen im *Stratum intermedium* die apikale Membran deutlicher detektiert wird. Die Ziege wiederum zeigt nur im *Stratum superficiale* eine klar positive Reaktion, die sich jedoch im Unterschied zum Schwein über das gesamte *Stratum* zieht (Tab. 8). Eine deutliche Steigerung der Reaktion weisen die Fleischfresser auf, die nahezu im gesamten Epithel positiv auf AQP5 reagieren (Abb. 28B). Auch hier findet man, insbesondere bei der Katze, die deutlichste Reaktion im apikalen Bereich der Zellmembran.



**Abb. 28:** AQP5 ist beim Schwein (A) nur in der äußersten Lage des *Stratum superficiale* lokalisiert, wohingegen bei der Katze (B) das gesamte Hornhautepithel AQP5 aufweist. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalaun.

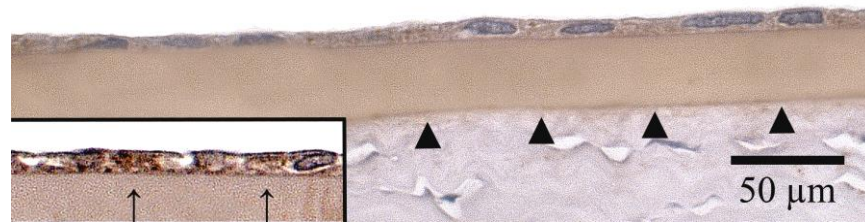
#### 4.3.6 Elastin

Der Gehalt von elastischen Fasern in der Hornhaut wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers BA-4 gegen Elastin untersucht. In keinem der immunhistochemischen Präparate der untersuchten Tierarten konnte innerhalb der Hornhaut Elastin detektiert werden. Allerdings zeigen sowohl die Positivkontrolle als auch kleinere Gefäße im Bereich der Konjunktiva bzw. der Sklera jeweils eine eindeutig positive Reaktion.

#### 4.3.7 Kollagen Typ VIII

In den gesamten endothelialen Zellen der Hornhaut kann spezieübergreifend eine positive Reaktion des polyklonalen Antikörpers gegen Kollagen Typ VIII nachgewiesen werden. Bei den Pflanzenfressern und dem Schwein färbt sich das komplette Zytoplasma gleichmäßig um den gut abgrenzbaren Zellkern an (Abb. 29). In den Endothelzellen von Hund und Katze dominiert hingegen eine etwas lockerere Verteilung der braungefärbten Granula (Abb. 29, Insert). Die an das hintere Hornhautepithel angrenzende Descemetische Membran weist bei allen betrachteten Tierarten grundsätzlich eine moderate bis intensive Färbung auf. Beim Pferd ergibt sich zusätzlich ein Muster aus feinen, vertikal angeordneten Streifen. Desweiteren verdichtet sich hier die Descemetische Membran nochmals zum Stroma hin horizontal. Im Vergleich dazu erscheint die Descemetische Membran der anderen Tierarten homogen gefärbt (Abb. 29). Bei den Wiederkäuern kann eine moderate Färbung beobachtet

werden, die hingegen beim Schwein und der Katze einen dunkleren Farbton annimmt. Der Hund zeigt eine weitere Feinheit, die darin besteht, dass das stromale Drittel eine intensiv gefärbte Bande darstellt, die sich zum moderat gefärbten posterioren Anteil der Descemetschen Membran deutlich abgrenzt. Bei Betrachtung des vorderen Hornhautepithels und des Stromas kann kein positiver Farbumschlag in den dort angesiedelten Zellen oder der extrazellulären Matrix festgestellt werden.



**Abb. 29:** Endothel vom Schwein mit Descemetscher Membran (►). Insert: Endothelzelle einer Katze mit zahlreichen Kollagen-Typ-VIII-positiven Granula (↑). DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.

## 5 Diskussion

Das Interesse am morphologischen Aufbau der Hornhaut ist aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften sehr hoch. Als strukturelle und physiologische Grenze zur Außenwelt werden an die Hornhaut, je nach Habitat, neben der Lichtbrechung und Lichtzuführung ins Auge, hohe Anforderungen gestellt. Die Hornhaut bildet zur Außenwelt eine Barriere, die vielen Umwelteinflüssen unterliegt, auf die sie durch regelmäßige Zellerneuerung reagieren muss, um ihre Transparenz zu bewahren. Die bislang durchgeführten Untersuchungen wurden überwiegend an für die humanmedizinische Forschung ausgelegten Tiermodellen vorgenommen. Zwar sind bereits vereinzelte Daten unserer klassischen Haussäugetiere publiziert worden, jedoch wurde eine umfassende tierartenvergleichende Betrachtung der Hornhaut noch nicht durchgeführt (Buck, 1983; Hayashi et al., 2002; Broadwater et al., 2007; Rodriguez-Ramos Fernandez und Dubielzig, 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung der Licht- und Rasterelektronenmikroskopie, den physiologischen Feinaufbau der Hornhaut ausgewählter Haussäugetiere untereinander zu vergleichen. Der immunhistochemische Nachweis von Struktur- und Transmembranproteinen diente dazu, Rückschlüsse auf die Funktionalität der Hornhaut ziehen zu können. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich das Hornhautgewebe stetig erneuert, um eine intakte Schutzschicht zu gewährleisten. Ein besonderer Schwerpunkt der Diskussion wurde auf den Beitrag der einzelnen Hornhautschichten zur Transparenz sowie Stabilität der Hornhaut gelegt.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des vorderen Hornhautepithels zeigten bei kleiner Vergrößerung einen ähnlichen, tierartenübergreifenden Aufbau. Die flachen, polygonalen Zellen reflektierten die Elektronenstrahlen in unterschiedlichem Maße, wodurch die Epithelzellen, in verschiedenen Graustufen dargestellt, eine mosaikartige Oberfläche bildeten. Bei stärkerer Vergrößerung der Epithelzellen sowie nach Reinigung der Epitheloberfläche mittels Ultraschall wurden Oberflächenprojektionen deutlich erkennbar. Auf den dunkleren, zugleich oberflächiger wirkenden Zellen, fanden sich weniger dieser Ausstülpungen als auf den helleren Zellen. Erstere scheinen ältere, kurz vor der Ablösung des Epithelverbands stehende Zellen zu sein. Folgerichtig bilden sich die Membranausstülpungen mit zunehmender Differenzierung zurück. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für das Kaninchen und den Menschen beschrieben (Kenyon, 1979; Doughty und Fong, 1992).

Die Ausgestaltung der Membranausstülpungen wies im Vergleich zwischen den verschiedenen untersuchten Tierarten variierende Muster auf. Beim Schwein konnte eine fingerabdruck-ähnliche Anordnung von langen, schmalen *Microplicae* dargestellt werden. Im Kontrast dazu waren die *Microplicae* von Pferd und Rind etwas kürzer und modulierten sich plastischer hervor. Die Fleischfresser und die Ziege zeigten hingegen kürzere Ausstülpungen (*Microvilli*). Zusätzlich waren bei der Ziege kreisrunde, erhabene Leisten zu erkennen. Ähnlich gestaltete Ringe konnten in Untersuchungen von Pfister (1973) beim Kaninchen beobachtet werden. In der Arbeit von Collin und Collin (2000) wurden ebenfalls unterschiedlich ausgebildete Netzwerke auf den Epitheloberflächen mehrerer Wirbeltiere festgestellt.

Trotz stetiger Desquamation der oberflächlichen Zellen ist das vordere Hornhautepithel in der Lage, eine glatte Oberfläche zu bilden. Hierfür ist der präkorneale Tränenfilm, der dem Hornhautepithel aufliegt, von entscheidender Bedeutung. Über die Membranausstülpungen vergrößert sich die Epitheloberfläche der Hornhaut, sodass die muköse Tränenschicht besser daran haften kann und dadurch stabilisiert wird. Dies dient einem intakten Tränenfilm, der das Auge in vielerlei Hinsicht schützt und eine wichtige optische Grenzfläche bildet (Lemp und Blackman, 1981; Nichols et al., 1983). Länglich organisierte *Microplicae*, wie sie beim Schwein zu finden sind, erzeugen eine höhere Stabilität im Vergleich zu den kürzeren *Microvilli* der Fleischfresser (Uehara et al., 1991). Bei grabenden Wirbeltieren wurden ähnliche Strukturen wie beim Schwein nachgewiesen (Collin und Collin, 2000), was den Schluss zulässt, dass die Ausstattung der epithelialen Oberflächenprojektionen mit dem Habitat und der Nahrungsbeschaffung im Zusammenhang steht.

Bei Betrachtung des Grundaufbaus der Hornhaut stellte sie sich bei den untersuchten Spezies als vierschichtiges, transparentes Gewebe dar. Die einzelnen Schichten ließen sich in das Hornhautepithel, die Descemetische Membran, das Stroma und das Endothel unterteilen. Eine bei verschiedenen Spezies (Mensch, Katze, Rind, Elefant, Vögel) postulierte Bowmansche Membran (Linsenmayer et al., 1984; Murphy et al., 1992; Merindano et al., 1997; Hayashi et al., 2002) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Bowmansche Membran wird beim Menschen als eine  $9,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$  dicke, azelluläre, homogene Struktur aus drei bis vier Schichten kollagener Fasern beschrieben (Pouliquen et al., 1966; Jacobsen et al., 1984; Germundsson et al., 2012). Bei den untersuchten Tierarten konnte zwar eine, dem Hornhautepithel angrenzende, feine Basalmembran mittels der PAS-Färbung festgestellt werden, die sich aber nicht als eigenständige Hornhautschicht bezeichnen lässt. Der im

Rahmen dieser Arbeit festgestellte Grundaufbau entspricht somit auch mehreren Untersuchungen bei Karni- und Herbivoren sowie einer vergleichenden Darstellung bei Nagetieren (Murphy et al., 1990; Merindano et al., 2002; Almubrad und Akhtar, 2012; Rodriguez-Ramos Fernandez und Dubielzig, 2013). Im Gegensatz dazu wurde bei Meerschweinchen eine  $2,23 \pm 0,38 \mu\text{m}$  dicke Bowmansche Membran im Transmissionselektronenmikroskop nachgewiesen (Cafaro et al., 2009). Auch beim Hund und Pferd wurde eine deutlich erkennbar ausgebildete, epitheliale Basalmembran dargestellt, welche allerdings nicht als Bowmansche Membran bezeichnet wird (Abrams et al., 2002; Ledbetter und Scarlett, 2009). Insgesamt herrscht Uneinigkeit darüber, ob bei den Tieren eine dem Menschen analoge Bowmansche Membran existiert.

Das direkten Umwelteinflüssen ausgesetzte Hornhautepithel bildet die äußerste Schicht des vorderen Augenpols. Es zeigte, bei den in dieser Arbeit untersuchten Haustieren, deutliche Variationen der Schichtung, die sich insbesondere auf die Anzahl der Zellschichten bezogen. Mit zwölf bis fünfzehn Zellschichten und einer mittleren Schichtdicke von  $286,1 \mu\text{m}$  wies das Pferd das am stärksten ausgebildete Epithel auf, wohingegen das Epithel der Katze aus nur sechs bis sieben Schichten bestand, die im Durchschnitt  $87,2 \mu\text{m}$  ergaben. Insbesondere das *Stratum superficiale*, das stetiger Zellablösung unterliegt, variierte in seiner Ausprägung. Dies lässt, wie bereits von Buck (1983) postuliert wurde, vermuten, dass die Epitheldicke der Hornhaut hauptsächlich vom natürlichen Habitat abhängt. Das Pferd und Rind sind als Bewohner offener Weideflächen stärker harschen Umwelteinflüssen ausgesetzt als die sich schuttsuchenden Fleischfresser Hund und Katze. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Arbeit von Almubrad und Akhtar (2012), in der ein besonders dickes Hornhautepithel beim Wüstenbewohner Kamel beschrieben wurde.

Cytokeratine spielen eine wichtige Rolle in der Integrität vieler epithelialer Gewebearten. Franke et al. (1981) erbrachten den Nachweis von Cytokeratin 1 und 2 in der Hornhaut von Versuchsnagern und schlossen daraus, dass das Verteilungsmuster der Cytokeratine mehr vom Zelltyp abhängig ist als von der Spezies. Dies konnte insofern immunhistochemisch bestätigt werden, als bei allen untersuchten Tierarten die Expression von Cytokeratin 1 und 2 überwiegend im *Stratum superficiale* dargestellt werden konnte. Das *Stratum intermedium* wurde beim Nachweis von Cytokeratin 2 nicht (Schwein) oder nur moderat (Wiederkäuer, Pferd) angefärbt, wohingegen es beim Fleischfresser sehr deutlich markiert wurde. Um die Expression von Cytokeratin 3 zu untersuchen, wurde der Antikörper CK3/2p herangezogen,

der sowohl Cytokeratin 3 als auch Cytokeratinsubtyp 2p detektiert. Das Cytokeratin 3 zeigt zwar eine auffällige Sequenzhomologie (86 %) mit Cytokeratin 2p, wurde jedoch als hornhautspezifisch beschrieben (Collin et al. 1992b; Wei et al., 1993). Beim Rind konnte Cytokeratin 3 wie im humanen Hornhautepithel (Pitz und Moll, 2002) in allen Epithelschichten sichtbar gemacht werden, wobei das *Stratum basale* in der Peripherie kaum angefärbt wurde. Im Gegensatz dazu beschränkte sich die Expression bei den übrigen Spezies auf das *Stratum superficiale*. Bei der Katze wurde zusätzlich noch die Flügelzellschicht deutlich markiert.

Mutationen in Genabschnitten, die für Cytokeratine kodieren, wurden mit vererbbaaren Hautkrankheiten in Verbindung gebracht (Cheng et al., 1992; Chipev et al., 1992). Cytokeratin 3 bildet gemeinsam mit Cytokeratin 12 ein für die Hornhaut essentielles Paar. Es ist bekannt, dass Cytokeratin 12-defiziente Mäuse eine sehr brüchige Hornhaut aufweisen und das Epithel keine fest verankerte Oberfläche bildet (Kao et al., 1996). Setzt man die Expression der untersuchten, miteinander verwandten Cytokeratine (Collin et al., 1992a) in einem tierartigen Vergleich zu den Hornhautepithelschichten, so kann man einen Zusammenhang, insbesondere bei den Fleischfressern, erkennen. In den eigenen Untersuchungen wiesen die Fleischfresser das dünnste Hornhautepithel auf, zeigten jedoch im Gegenzug die stärkste Expression der Cytokeratine. Daher kann die Vermutung geäußert werden, dass die stabilisierenden Cytokeratine beim Fleischfresser aus kompensatorischen Gründen vermehrt exprimiert werden.

Ein stabiler Zellverband ist wichtig, um ausreichend Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen zu bieten. Die physikalische und chemische Barrierefunktion der Hornhaut kann daher zusätzlich über das Zellverbindungsprotein Claudin-1 gewährleistet werden (Günzel und Yu, 2013). In eigenen Untersuchungen wurden insbesondere die apikalen Zellmembranen des *Stratum superficiale* als Claudin-1-positiv ermittelt. Im Kontrast dazu stehen an Labornagern erarbeitete Ergebnisse, die überwiegend eine Expression von Claudin-1 im *Stratum intermedium* und *Stratum basale* ergaben (Yi et al., 2000; Sosnová-Netuková et al., 2007). Das in der vorliegenden Untersuchung gezeigte Expressionsmuster beim Pferd bildete eine Ausnahme und glich mehr dem von Yi et al. (2000) und Sosnová-Netuková et al. (2007) beschriebenen Bild. Bei allen übrigen Tierarten wurde indes das *Stratum superficiale* am deutlichsten markiert. Dies deckt sich mit den Aussagen von Yoshida et al. (2009), die ebenfalls eine Lokalisation von Claudin-1 in oberflächigen Zelllagen der Hornhaut beschrieben.



Einheitliche Resultate ergaben sich hingegen bei der Betrachtung des Endothels. Im Zuge dieser Arbeit färbte sich das Endothel tierarteneinheitlich Claudin-1-positiv an. Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Hornhautgewebe können diese Feststellung bestätigen (Inagaki et al., 2013). Das tight junctions-bildende Claudin-1 erfüllt in Oberflächenepithelien wie z. B. der *Epidermis* eine wichtige Barrierefunktion (Furuse et al., 1998b; Inai et al., 1999; Brandner et al., 2002). Eine Studie an Claudin-1-defizienten Mäusen ergab, dass es entscheidend für die Regulation von transzellulären Wasserverlusten verantwortlich ist (Furuse et al., 2002). Die Transparenz der Hornhaut ist maßgeblich abhängig vom relativen Dehydratationszustand des Stromas, den es gilt aufrecht zu erhalten (Klyce und Crosson, 1985). Claudin-1 scheint sowohl über das Epithel als auch über das Endothel die Hornhaut effektiv vor Austrocknung oder Quellung zu schützen (Furuse et al., 2002).

Neben den Zellverbindungsproteinen gibt es in der Hornhaut weitere Mechanismen, um den Wassergehalt zu regulieren. Das Hornhautstroma, welches sich in einem relativen Dehydratationszustand befindet, wird auf der einen Seite über das Hornhautepithel von der hyperosmolaren Tränenflüssigkeit und von der anderen Seite über das Endothel vom hypoosmolaren Kammerwasser abgeschirmt. Es bedarf eines präzise regulierten Hydratationszustandes, um die Hornhauttransparenz zu gewährleisten (Freegard, 1997). Sowohl im Hornhautepithel als auch im -endothel finden sich verschiedene Ionentransporter und Wasserkanäle, die einen osmotischen Gradienten und damit verbunden Wasserstrom ermöglichen (Verkman, 2003). Zum besseren Verständnis der Instandhaltung der kornealen Transparenz wurde das Verteilungsmuster von AQP1 und AQP5 tierartlich verglichen.

Interessanterweise begrenzt sich die Expression von AQP5, ähnlich wie bei Claudin-1, auf das Hornhautepithel. Es wurden überwiegend die apikalen Zellmembranen des *Stratum superficiale* positiv detektiert. Dies deckt sich mit vorangegangenen Untersuchungen beim Menschen und Labornagern (Funaki et al., 1998; Hamann et al., 1998; Levin und Verkman, 2004). Zusätzlich zeigte die Katze und in geringem Maße das Rind eine Expression im *Stratum intermedium* und *Stratum basale*. Hamann et al. (1998) beschrieb einen über AQP5 ermöglichten, osmotischen Wassertransport über das Hornhautepithel. Das Expressionsmuster von AQP5 ist ein Hinweis auf eine flexible epitheliale Wasserregulation der Hornhaut, die den Mechanismus über Claudin-1 ergänzt.

AQP1 wurde, wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte (Wen et al., 2001; Zhang und Wang, 2007), bei allen Tierarten im Endothel deutlich exprimiert. Ebenso konnte

in den Keratozyten stets AQP1 nachgewiesen werden, wobei hier tierartliche Unterschiede zu erkennen waren. Das Pferd zeigte über das gesamte Stroma eine gleichmäßige Färbung der Keratozyten. Anders dazu nahm beim Schwein und den Wiederkäuern die Expression zum Epithel hin kontinuierlich ab. Das zentrale Stroma war bei den Fleischfressern im Vergleich zu den anterioren und posterioren Abschnitten erkennbar reduzierter markiert. AQP1 ermöglicht einen osmotisch erzeugten, bidirektionalen Flüssigkeitsstrom über das Endothel (Meinild et al., 1998; Thiagarajah und Verkman, 2002; Verkman, 2005) und beugt somit bei Störungen des Wasserhaushaltes einem Hornhautödem vor (Hodson et al., 1991; Hamann et al., 1998). Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Ist das Endothel pathologisch verändert oder durch mechanische Einflüsse geschädigt (z.B. Linsenluxation, Phakoemulsifikation), wird AQP1 herabreguliert, was zu einer Hornhauttrübung führt (Yi und Dana, 2002; Macnamara et al., 2004). Ein tierartlich unterschiedliches Quellverhalten der Hornhaut wurde bereits von Brunette et al. (2011) beschrieben. Bei der Xenotransplantation von porzinen und felines Hornhäuten wurden deutlich bessere Ergebnisse mit feline Gewebe erzielt. Letzteres zeigte eine deutlich reduzierte Neigung zu Ödemen. Im Vergleich zum Schwein wies die Katze in den eigenen Untersuchungen eine kontinuierlichere Verteilung von AQP1 in den Keratozyten auf. Diese vermehrte Expression kann einen möglichen Baustein in einer besseren Regulation des kornealen Wasserhaushaltes darstellen.

Garner und Alexander postulierten bereits vor ca. 30 Jahren das Auftreten von elastischen Fasern in der humanen Hornhaut. Sie wiesen histologisch Oxytalan als Vorläufer von Elastin nach (Garner und Alexander, 1986). Um die Anpassungsfähigkeit der Hornhaut insbesondere im Bereich des vermehrt belasteten Limbus näher zu verstehen, untersuchten Kamma-Lorger et al. (2010) die Hornhaut auf elastische Fasern. Sie konnten einen mit elastischen Fasern durchsetzten, kollagenen Ring am Hornhautrand identifizieren. Der Hauptbestandteil elastischer Fasern ist für gewöhnlich Elastin, das dafür bekannt ist, in der Haut die mechanischen Eigenschaften gegenüber äußeren Druck- und Zugkräften zu verbessern (Oxlund et al., 1988). Übereinstimmend mit Hirano et al. (1991) und Isnard et al. (2004) konnte dagegen im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch kein Elastin nachgewiesen werden. Elastin ist somit nicht für die elastischen Eigenschaften der Hornhaut der untersuchten Haussäugetiere verantwortlich.

Nichtsdestotrotz kann die Hornhaut flexibel auf Druckeinflüsse reagieren und ist in der Lage, ihren spezifischen Krümmungszustand zu erhalten. Durch pathologische Veränderungen oder Mutationen kann die Stabilität der Hornhaut maßgeblich beeinflusst werden. Eine Genmutation von Col8A2 führte bei Menschen und Mäusen zu einer Fehlbildung des Kollagen Typ VIII. Dies hat eine Instabilität der Hornhaut zur Folge, die zum Keratokonus führen kann oder als Ursache der Fuchs'schen Endotheldystrophie gilt (Biswas et al., 2001; Puk et al., 2009). Beim Menschen findet sich Kollagen Typ VIII überwiegend in der Descemetschen Membran und wurde gelegentlich mit elastischen Fasern in Verbindung gebracht (Davis et al., 1990; Kittelberger et al., 1990; Shuttleworth, 1997). Allerdings kann sich die Zusammensetzung von Basalmembranen tierartlich unterscheiden (Woodrow et al., 1989). Das Vorkommen von Kollagen Typ VIII konnte im Rahmen dieser Arbeit bei allen untersuchten Tierarten in der Descemetschen Membran und im Endothel demonstriert werden. Somit wird übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (Labermeier und Kenney, 1983; Kapoor et al., 1986) deutlich, dass die Produktion von Kollagen Typ VIII im angrenzenden Hornhautendothel stattfindet.

Die Formfestigkeit stellt ein Funktionsmerkmal des Typ VIII Kollagens dar. Es bildet in der Basalmembran neben den bekannten Netzwerken aus Laminin oder Kollagen Typ IV eine Ergänzung, um die mechanischen Eigenschaften zu modulieren (Yurchenco und O'Rear, 1994; Danielsen, 2004). Hierfür besonders effektiv scheint die hexagonale Anordnung der kurzen Kollagenfibrillen zu sein (Jakus, 1956; Sawada et al., 1990; Levy et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte die Hexagonalität exemplarisch beim Rind und Pferd rasterelektronenmikroskopisch dargestellt werden. Durch diese hexagonale Gitterstruktur ergibt sich die Fähigkeit, dem Augeninnendruck (intraocular pressure, IOP) zu widerstehen und gleichzeitig durch den hohen Ordnungsgrad den Anforderungen an ein transparentes Gewebe gerecht zu werden. Betrachtet man den IOP tierartenvergleichend (Ruiz-Ederra et al., 2005; Ribeiro et al., 2010; Andrade et al., 2011; Andrade et al., 2012), so besteht eine positive Korrelation zwischen diesem und den ermittelten Schichtdicken der Descemetschen Membran (Danielsen, 2004). Die dünnste Descemetsche Membran konnte in eigenen Untersuchungen beim Schwein festgestellt werden. Der IOP ist hier im Vergleich zum Pferd, mit der dicksten Membran, erkennbar reduziert. Es wird offensichtlich, dass die Stärke der Descemetschen Membran die Widerstandsfähigkeit der Hornhaut beeinflusst. In vergleichenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass Schweinehornhäute geringeren mechanischen

Kräften Stand halten können als humane Hornhäute mit einer ausgeprägteren Descemetischen Membran (Elsheikh et al., 2008).

Das zuvor diskutierte Cytokeratin 3 ist im Hornhautgewebe als spezifischer Marker der terminalen Zelldifferenzierung anerkannt (Schermer et al., 1986; Kasper et al., 1988). Bei selbst durchgeführten Tests wurde überwiegend das *Stratum superficiale* entlang des gesamten Hornhautepithels CK3-positiv markiert. Ausnahmen bildeten nur die Katze und das Rind, bei denen auch das *Stratum intermedium* und das *Stratum basale* positiv reagierten. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass sich die erwähnten Zellschichten in einem ausdifferenzierten Stadium befinden. Die eigenen Untersuchungen stimmen nur in begrenztem Maße mit den Beobachtungen von Schermer et al. (1986) und Wiley et al. (1991) überein. Sie ermittelten eine Expression in allen Hornhautepithelschichten mit Ausnahme des limbalen *Stratum basale*.

Wie bereits erwähnt, ist das Hornhautepithel direkten Schadeinwirkungen aus der Umwelt ausgesetzt, weshalb es eine besonders schnelle Zellerneuerung aufweisen muss, um seine Funktion aufrecht zu erhalten. Mittels des Stammzellmarkers p63 (Pellegrini et al., 2001; Hsueh et al., 2004) wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, Stammzellen im vorderen Hornhautepithel immunhistologisch zu lokalisieren. Wie die Ergebnisse zeigen, kann der Limbus als Reservoir für Stammzellen angesehen werden. Mit Ausnahme der Ziege fand man dort p63 bei allen untersuchten Spezies deutlich exprimiert. Die Expression begrenzte sich überwiegend auf das *Stratum basale*. Interessanterweise wiesen die Fleischfresser neben dem limbalen Reservoir auch in der Peripherie und im Zentrum teils deutlich positiv markierte Zellen auf. Diese Ergebnisse stehen größten Teils im Einklang mit Untersuchungen beim Menschen, Pferd und Hund (Chen et al., 2004; Moriyama et al., 2013; Morita et al., 2014). Das limbale Stammzellenreservoir beim Menschen wird in einer anatomisch klar abgrenzbaren Nische, den Vogtschen Palisaden, beschrieben (Davanger und Evensen, 1971; Dua und Azuara-Blanco, 2000), wohingegen beim Hund entlang der gesamten Hornhaut einzelne Stammzellen erwähnt werden (Morita et al., 2014). Um die stetige Zellerneuerung des Hornhautepithels zu erklären, entstand aufgrund der limbalen Lage der Stammzellen die akzeptierte Hypothese der zentripetalen Zellmigration. Dabei produzieren die limbalen Stammzellen sogenannte transit amplifying cells, die sich weiterteilen und zentripetal wandern. Im Zuge dessen lösen sich die Tochterzellen von der basalen Epithelzellschicht und differenzieren sich aus (Lehrer et al., 1998; Li et al., 2007). Auf Grundlage des in eigenen

Untersuchungen erstellten Expressionsmusters von p63 bei Fleischfressern wird, ausgehend von der gesamten basalen Epithelzellschicht in der Hornhaut, ein zusätzlicher Mechanismus der Epithelerneuerung vermutet. Es ist anzunehmen, dass die einzelnen basal gelegenen Stammzellen jeweils dezentralisiert Tochterzellen produzieren, die zentrifugal in die weiter oben gelegenen Epithelzellschichten geschoben werden. Dies stimmt mit den Überlegungen von Majo et al. (2008) überein.

Um die Proliferation der Hornhautzellen näher zu betrachten, wurden zusätzlich zwei Proliferationsmarker (PCNA und PHH3) immunhistochemisch getestet. Bezogen auf PCNA-markierte Zellen waren Teilungsstadien überwiegend im Epithel der Hornhaut zu finden. Die zum größten Teil im limbalen *Stratum basale* liegenden, proliferierenden Zellen wurden tierartlich unterschiedlich stark exprimiert. Am stärksten war die Expression mit durchschnittlich zwölf PCNA-positiven epithelialen Basalzellen je 100 Zellen beim Pferd ausgeprägt, die Ziege und das Schwein wiesen hingegen mit im Mittel ca. zwei bis drei teilungsaktiven Zellen eine deutlich geringere Expression auf. Mit Ausnahme von Schwein und der Katze konnte im Stroma und Endothel keine Reaktion nachgewiesen werden. Yamada und Mashima (1995) konnten bereits beim Kaninchen PCNA-positive Zellen im epithelialen *Stratum basale* der Hornhaut nachweisen, allerdings wurde, im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen, kein Unterschied zwischen Limbus, Peripherie und Zentrum beschrieben. Ebenfalls übereinstimmend mit den Erkenntnissen dieser Arbeit sind Untersuchungen an humanen Hornhäuten. Das Endothel und die Keratozyten wiesen erst nach Induktion in einem Kulturmedium eine Proliferation auf (Gan et al., 1998). Die PCNA-negativen Bereiche der Hornhaut, wie das *Stratum intermedium* und *Stratum superficiale*, lassen den Rückschluss zu, dass dort liegende Zellen bereits differenzierter sind und nicht mehr proliferieren. Die bereits erwähnte Theorie der Zellmigration zur kornealen Epithelerneuerung wird durch diese Ergebnisse unterstützt.

PCNA besitzt eine Halbwertszeit von ca. 20 Stunden, wodurch auch Zellen PCNA-positiv angefärbt werden, die bereits den Zellteilungszyklus verlassen haben (Yu et al., 1992). Zur spezifischeren Darstellung der proliferativen Zellen wurden daher mittels des Antikörpers gegen PHH3 selektiv die Phasen der Mitose (Pro-, Meta-, Ana- und Telophase) detektiert (Ladstein et al., 2010). Im Vergleich zum Proliferationsnachweis mit PCNA wurden mit maximal zwei Zellen je 100 Epithelzellen deutlich weniger Zellen PHH3-positiv markiert. Dies steht im Konsens mit den Untersuchungen von Dorà et al. (2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei allen Tierarten eine mäßige Pigmentierung im limbalen Stroma festgestellt werden. Allerdings war nur bei Pferd, Ziege und Rind eine unterschiedlich starke Pigmentierung im limbalen *Stratum basale* zu erkennen. Samuelson (2013) beschrieb hingegen für alle Haussäuger ein pigmentiertes *Stratum basale* und *Stratum intermedium* im Limbus. Eine individuelle Variation der limbalen Pigmentierung erscheint am wahrscheinlichsten (Broadwater et al., 2007; Rodriguez-Ramos Fernandez und Dubielzig, 2013). Die Pigmentierung im *Stratum basale* erlaubt bei operativen Eingriffen eine genaue Abgrenzung des Limbus, wodurch u. a. die Entnahme zur Isolierung von epithelialen Stammzellen der Hornhaut erleichtert wird (Moriyama et al., 2013).

## 6 Zusammenfassung

### **Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie der Hornhaut der Haus-säugetiere – Eine immunhistochemische und rasterelektronenmikroskopische Studie**

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskopie sowie immunhistochemischen Methoden, die Morphologie der Hornhaut im tierartlichen Vergleich an Hand unserer Haussäugetiere detailliert zu beschreiben. Für die Untersuchungen wurden die Hornhäute von 28 Schweinen, 11 Rindern, 2 Ziegen, 6 Pferden, 4 Hunden und 5 Katzen verwendet. Speziesspezifische Besonderheiten wurden bildlich dokumentiert und zur Verdeutlichung tabellarisch dargestellt.

Die Hornhaut unserer Haussäugetiere baut sich aus dem Hornhautepithel, dem Stroma, der Descemetschen Membran und dem Hornhautendothel auf. Eine Bowmansche Membran konnte nicht dargestellt werden.

Die Fleischfresser besitzen verglichen mit den Huftieren eine deutlich dünnere Hornhaut. Insbesondere das dreischichtige Epithel (*Stratum basale*, *Stratum intermedium* und *Stratum superficiale*) besteht bei den Fleischfressern aus einer kleineren Anzahl an Zelllagen. Die Cytokeratine 1, 2 und 3, als Bestandteile des Zytoskeletts, konnten immunhistochemisch bei allen untersuchten Tierarten, insbesondere im *Stratum superficiale* des Hornhautepithels, nachgewiesen werden. Das vom Zentrum aus an Höhe abnehmende Hornhautepithel lässt unter dem Rasterelektronenmikroskop auf der Oberfläche der polygonalen Epithelzellen feine Membranausstülpungen erkennen, die sich beim Fleischfresser in Form von kurzen *Microvilli* darstellen. Das Pferd, Rind und Schwein weisen längere *Microplicae* auf, die bei der Ziege einzelne ringförmige Kringel bilden.

Eine beim Pferd und bei den Wiederkäuern auch epithelial zu findende Pigmentierung, lässt sich im Stroma tierartenübergreifend im Bereich des Limbus erkennen. Mit Ausnahme des anterioren Bereichs weisen die im Stroma liegenden Keratozyten einen geordneten, parallelen Verlauf auf.

Tierartliche Unterschiede liegen in der Ausbildung der Descemetschen Membran vor. Das Pferd besitzt die dickste Descemetsche Membran, wohingegen das Schwein die am schwächsten ausgebildete Membran vorweist. Endothelial produziertes Kollagen Typ VIII bildet einen Bestandteil der hexagonalen Gitterstruktur der Descemetschen Membran,

wodurch die Elastizität der Hornhaut möglicherweise mitbestimmt wird. Der Nachweis von Elastin ist hingegen im Hornhautgewebe negativ verlaufen.

Das einschichtige Hornhautendothel besteht aus Zellen von hexagonaler Form. Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen das Membranprotein AQP1 enthalten, das auch in den Keratozyten in tierartlicher Variation exprimiert wird. Hingegen kann das AQP5 ausschließlich im Hornhautepithel identifiziert werden. Durch AQP1 und AQP5 wird der für die Transparenz der Hornhaut wichtige relative Dehydratationszustand aufrecht erhalten. Mit Claudin-1 konnte im Hornhautepithel und -endothel ein tight junctions-bildendes Zellverbindungsprotein markiert werden.

Mit Antikörpern gegen p63 sowie PCNA und PHH3 wurde untersucht, wie sich die Hornhaut erneuert. Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine Zellerneuerung überwiegend epithelial stattfindet. Limbal befindet sich bei allen untersuchten Tierarten im *Stratum basale* ein Stammzellreservoir, das bei den Fleischfressern entlang des Hornhautepithels durch einzelne p63-positive Zellen ergänzt wird. Die mittels PCNA und PHH3 dargestellten mitotischen Zellen sind ebenfalls im *Stratum basale* lokalisiert.



## 7 Summary

### **A comparative analysis of the morphology of the cornea in domestic animals -an immunohistochemical and scanning electron microscopic study**

The goal of this study was to describe and compare the detailed morphology of the cornea in domestic animals using light and scanning electron microscopy as well as immunohistochemistry. Therefore corneas of 28 pigs, 11 cows, 2 goats, 6 horses, 4 dogs and 5 cats have been analyzed. Species-specific features have been illustrated and tabulated for clarification.

The cornea of the domestic animals is composed of the corneal epithelium, the stroma, the Descemet's membrane and the corneal endothelium. A Bowman's layer was not detectable.

The carnivores show the thinnest cornea compared to the ungulate. In particular the three-layered epithelium (*stratum basale*, *stratum intermedium* and *stratum superficiale*) consists of a smaller number of cell deposits in carnivores. As a part of the cytoskeleton the cytokeratins 1, 2 and 3 could be demonstrated immunohistochemical in all probed species, especially in the *stratum superficiale* of the corneal epithelium. Decreasing from the center of the cornea, the corneal epithelium reveals by scanning electron microscopy surface projections on the polygonal epithelial cells which represent short *microvilli* in carnivores. In horse, cow and pig longer *microplicae* are visible creating ring-shaped crinkles in goats. An epithelial provided pigmentation in horse and ruminants is also recognizable in the limbal stroma in all species examined in that present study. Except of the anterior part the keratocytes are arranged regular and parallel within the stroma.

There is a species-specific discrepancy in formation of the Descemet's membrane. Exhibiting the thickest Descemet's membrane in horse, the poorest membrane is developed in pig. The endothelial produced collagen VIII, shown as a component of the Descemet's membrane's hexagonal lattice, is potentially associated with cornea's elasticity. However the detection of elastin in corneal tissue has been negative.

The corneal monolayer endothelium consists of hexagonal-shaped cells. Furthermore corneal endothelium could be shown to contain AQP1 which is also present in keratocytes in a species-specific manner. In contrast AQP5 has been detected exclusively in the corneal epithelium. With the help of AQP1 and AQP5 the transparency giving state of relative stromal

dehydration is sustainable. In the corneal epithelium and endothelium tight-junction-specific integral membrane protein claudin-1 was detectable.

To investigate the corneal regeneration antibodies against p63 as well as against PCNA and PHH3 have been used. The results point out a predominant epithelial occurrence of cellular proliferation in the cornea. A stem cell compartment resides in the limbal *stratum basale* which is supplemented in carnivores by single p63-positive cells along the corneal epithelium. Mitotic cells labeled by PCNA and PHH3 are localized in the *stratum basale* as well.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Literaturverzeichnis

- Abrams G.A., Bentley E., Nealey P.F., Murphy C.J.** (2002)  
Electron microscopy of the canine corneal basement membranes.  
*Cells Tissues Organs*, **170** (4): 251-257
- Akpek E.K., Gottsch J.D.** (2003)  
Immun defense at the ocular surface.  
*Eye (Lond)*, **17** (8): 949-956
- Alexander R.A., Garner A.** (1983)  
Elastic and precursor fibres in the normal human eye.  
*Exp Eye Res*, **36** (2): 305-315
- Almubrad T., Akhtar S.** (2012)  
Ultrastructure features of the camel cornea-- collagen fibril and proteoglycans.  
*Vet Ophthalmol*, **15** (1): 36-41
- Altmannsberger M., Osborn M., Schauer A., Weber K.** (1981)  
Antibodies to different intermediate filament proteins. Cell type-specific markers on paraffin-embedded human tissues.  
*Lab Invest*, **45** (5): 427-434
- Ammann K., Pelloni G.** (1971)  
Der Bulbus oculi des Hundes.  
*Schweiz Arch Tierheilkd*, **113** (6): 287-290
- Andrade S.F., Kupper D.S., Pinho L.F., Franco E.C., Prativiera M.V., Duarte R.R., Junqueira J.R.** (2011)  
Evaluation of the Perkins handheld applanation tonometer in horses and cattle.  
*J Vet Sci*, **12** (2): 171-176
- Andrade S.F., Palozzi R.J., Giuffrida R., de Campos R.J., Santos G., Fukui R.M.** (2012)  
Comparison of intraocular pressure measurements between the Tono-Pen XL® and Perkins® applanation tonometers in dogs and cats.  
*Vet Ophthalmol*, **15** (Suppl 1): 14-20
- Argüeso P., Gipson I.K.** (2001)  
Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function.  
*Exp Eye Res*, **73** (3): 281-289
- Ban Y., Dota A., Cooper L.J., Fullwood N.J., Nakamura T., Tsuzuki M., Mochida C., Kinoshita S.** (2003)  
Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium.  
*Exp Eye Res*, **76** (6): 663-669

**Barbieri C.E., Pietenpol J.A. (2006)**

P63 and epithelial biology.  
*Exp Cell Res*, **312** (6): 695-706

**Bauer G.A., Burgers P.M. (1990)**

Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene.  
*Nucleic Acids Res*, **18** (2): 261-265

**Belmonte C., Tervo T.T., Gallar J. (2011)**

Sensory innervation of the eye.  
In: Levin L.A., Nilsson S.F., Ver Hoeve J., Wu S.M. (Hrsg.): Adler's physiology of the eye  
**11.** Auflage, *Elsevier Saunders*: 363-384

**Benya P.D., Padilla S.R. (1986)**

Isolation and characterization of type VIII collagen synthesized by cultured rabbit corneal endothelial cells. A conventional structure replaces the interrupted-helix model.  
*J Biol Chem*, **261** (9): 4160-4169

**Bettelheim F.A., Plessy B. (1975)**

The hydration of proteoglycans of bovine cornea.  
*Biochim Biophys Acta*, **381** (1): 203-214

**Bhasin M., Reinherz E.L., Reche P.A. (2006)**

Recognition and classification of histones using support vector machine.  
*J Comput Biol*, **13** (1): 102-112

**Bistner S.I., Rubin L., Aguirre G. (1973)**

Development of the bovine eye.  
*Am J Vet Res*, **34** (1): 7-12

**Biswas S., Munier F.L., Yardley J., Hart-Holden N., Perveen R., Cousin P., Sutphin J.E., Noble B., Batterbury M., Kielty C., Hackett A., Bonshek R., Ridgway A., McLeod D., Sheffield V.C., Stone E.M., Schorderet D.F., Black G.C. (2001)**

Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy.  
*Hum Mol Genet*, **10** (21): 2415-2423

**Blümcke S., Morgenroth K. Jr. (1967)**

The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea.  
*J Ultrastruct Res*, **18** (5): 502-518

**Brandner J.M., Kief S., Grund C., Rendl M., Houdek P., Kuhn C., Tschachler E., Franke W.W., Moll I. (2002)**

Organization and formation of the tight junctions system in human epidermis and cultured keratinocytes.  
*Eur J Cell Biol*, **81** (5): 253-263

- Brauninger G.E., Shah D.O., Kaufman H.E.** (1972)  
Direct physical demonstration of oily layer on tear film surface.  
*Am J Ophthalmol*, **73** (1): 132-134
- Brini A., Porte A., Stoeckel M.E.** (1966)  
Development of the cornea in the chick embryo. Study under the electron microscope.  
*Doc Ophthalmol*, **20**: 309-332
- Brinkmann J.** (2001)  
Molekulare Aspekte der Kollagensynthese.  
*Aktuel Urol*, **32** (Suppl 1): 25-27
- Broadwater J.J., Schorling J.J., Herring I.P., Pickett J.P.** (2007)  
Ophthalmic examination findings in adult pygmy goats (*Capra hircus*).  
*Vet Ophthalmol*, **10** (5): 269-273
- Brunette I., Rosolen S.G., Carrier M., Abderrahman M., Nada O., Germain L., Proulx S.** (2011)  
Comparison of the pig and feline models for full thickness corneal transplantation.  
*Vet Ophthalmol*, **14** (6): 365-377
- Buck R. C.** (1983)  
Ultrastructural characteristics associated with the anchoring of corneal epithelium in several classes of vertebrates.  
*J Anat*, **137** (Pt 4): 743-756
- Cafaro T.A., Ortiz S.G., Maldonado C., Espósito F.A., Croxatto J.O., Berra A., Ale O.L., Torrealday J.I., Urrets-Zavalía E.A., Urrets-Zavalía J.A., Serra H.M.** (2009)  
The cornea of Guinea pig: structural and functional studies.  
*Vet Ophthalmol*, **12** (4): 234-241
- Casasco A., Giordano M., Danova M., Casasco M., Icaro Cornaglia A., Calligaro A.** (1993)  
PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. A combined immunocytochemical and flow cytometric study.  
*Histochemistry*, **99** (3): 191-199
- Castoro J.A., Bettelheim A.A., Bettelheim F.A.** (1988)  
Water gradients across bovine cornea.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **29** (6): 963-968
- Chan-Ling T.** (1989)  
Sensitivity and neural organization of the cat cornea.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **30** (6): 1075-1082
- Chen Z., de Paiva C.S., Luo L., Kretzer F.L., Pflugfelder S.C., Li D.-Q.** (2004)  
Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia.  
*Stem Cells*, **22** (3): 355-366
-

- Cheng J., Syder A.J., Yu Q.-C., Letai A., Paller A.S., Fuchs E. (1992)**  
The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes.  
*Cell*, **70** (5): 811-819
- Chipev C.C., Korge B.P., Markova N., Bale S.J., DiGiovanna J.J., Compton J.G., Steinert P.M. (1992)**  
A leucine----proline mutation in the H1 subdomain of keratin 1 causes epidermolytic hyperkeratosis.  
*Cell*, **70** (5): 821-828
- Clark B.A. (1974)**  
Mean topography of normal corneas.  
*Aust J Optom*, **57** (4): 107-114
- Collin C., Moll R., Kubicka S., Ouhayoun J.-P., Franke W.W. (1992a)**  
Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation.  
*Exp Cell Res*, **202** (1):132-141
- Collin C., Ouhayoun J.P., Grund C., Franke W.W. (1992b)**  
Suprabasal marker proteins distinguishing keratinizing squamous epithelia: cytokeratin 2 polypeptides of oral masticatory epithelium and epidermis are different.  
*Differentiation*, **51** (2): 137-148
- Collin S.P., Collin H.B. (1998)**  
A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates.  
*Clin Exp Optom*, **81** (6): 245-254
- Collin S.P., Collin H.B. (2000)**  
A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium.  
*Cornea*, **19** (2): 218-230
- Colman H., Giannini C., Huang L., Gonzalez J., Hess K., Bruner J., Fuller G., Langford L., Pelloski C., Aaron J., Burger P., Aldape K. (2006)**  
Assessment and prognostic significance of mitotic index using the mitosis marker phospho-histone H3 in low and intermediate-grade infiltrating astrocytomas.  
*Am J Surg Pathol*, **30** (5): 657-664
- Coulombe P.A., Omary M.B. (2002)**  
‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments.  
*Curr Opin Cell Biol*, **14** (1): 110-122
- Coulombe P.A., Tong X., Mazzalupo S., Wang Z., Wong P. (2004)**  
Great promises yet to be fulfilled: defining keratin intermediate filament function in vivo.  
*Eur J Cell Biol*, **83** (11-12): 735-746

**Coulombre A.J., Coulombre J.L. (1958)**

Corneal development. I. Corneal transparency.  
*J Cell Physiol*, **51**(1): 1-11

**Coulombre A.J., Coulombre J.L. (1964)**

Corneal development. 3. The role of the thyroid in dehydration and the development of transparency.  
*Exp Eye Res*, **3**: 105-114

**Cursiefen C., Schlötzer-Schrehardt U., Küchle M., Sorokin L., Breiteneder-Geleff S., Alitalo K., Jackson D. (2002)**

Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43** (7): 2127-2135

**Danielsen C.C. (2004)**

Tensile mechanical and creep properties of Descemet's membrane and lens capsule.  
*Exp Eye Res*, **79** (3): 343-350

**Davanger M., Evensen A. (1971)**

Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium.  
*Nature*, **229** (5286): 560-561

**Davidson H.J., Kuonen V.J (2004)**

The tear film and ocular mucins.  
*Vet Ophthalmol*, **7** (2): 71-77

**Davies S.B., Chui J., Madigan M.C., Provis J.M., Wakefield D., Di Girolamo N. (2009)**

Stem cell activity in the developing human cornea.  
*Stem Cells*, **27**(11): 2781-2792

**Davis P.F., Ryan P.A., Kittelberger R., Greenhill N.S. (1990)**

The collagenous protein with elastin crosslinks from Descemet's membrane is not related to type VIII collagen.  
*Biochem Biophys Res Commun*, **171** (1): 260-265

**Dawson D.G., Ubels J.L., Edelhauser H.F. (2011)**

Cornea and sclera.  
In: Levin L. A., Nilsson S. F., Ver Hoeve J., Wu S. M. (Hrsg.): Adler's physiology of the eye  
**11. Auflage, Elsevier Saunders: 71-130**

**Day R. (1950)**

Polysaccharides in ocular tissue.  
*Am J Ophthalmol*, **33** (2): 224-226

**de Groot B.L., Engel A., Grubmüller H. (2003)**

The structure of the aquaporine-1 water channel: a comparison between cryo-electron microscopy and X-ray crystallography.  
*J Mol Biol*, **325** (3): 485-493

---

- Debelle L., Alix A.J.** (1999)  
The structures of elastins and their function.  
*Biochimie*, **81** (10): 981-994
- Deeg C.A., Petry H., Erhard M.** (2005)  
Sehen  
In: von Engelhardt W., Breves G. (Hrsg.): Physiologie der Haustiere  
2. Auflage, *Enke Verlag, Stuttgart*: 86-95
- Diecke F.P., Cacace V.I., Montalbetti N., Ma L., Kuang K., Iserovich P., Fischbarg J.** (2011)  
Comparative permeabilities of the paracellular and transcellular pathways of corneal endothelial layers.  
*J Membr Biol*, **242** (1): 41-51
- Di Iorio E., Barbaro V., Ruzza A., Ponzin D., Pellegrini G., De Luca M.** (2005)  
Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration  
*Proc Natl Acad Sci USA*, **102** (27): 9523-9528
- Dorà N., Ou J., Kucerova R., Parisi I., West J.D., Collinson J.M.** (2008)  
PAX6 dosage effects on corneal development, growth, and wound healing.  
*Dev Dyn*, **237** (5): 1295-1306
- Doughty M.J., Fong W.K.** (1992)  
Topographical differences in cell area at the surface of the corneal epithelium of the pigmented rabbit.  
*Curr Eye Res*, **11** (12): 1129-1136
- Doughty M.J.** (1998)  
Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium ex vivo.  
*Tissue Cell*, **30** (6), 634-643
- Drenckhahn D.** (2004)  
Äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi).  
In: Benninghoff A., Drenckhahn D. (Hrsg.): Anatomie- Band 2  
16. Auflage, *Urban und Fischer, München*: 667-671
- Dua H.S., Azuara-Blanco A.** (2000)  
Limbal stem cells of the corneal epithelium.  
*Surv Ophthalmol*, **44** (5): 415-425
- Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.** (1991)  
Die Sinnesorgane.  
In: Budras K.D., Goller H., Hofmann R.R., Hummel G., Weyrauch K. D. (Hrsg.): Anatomie der Haustiere  
1. Auflage, *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*: 363-378



- Elsheikh A., Alhasso D., Rama P. (2008)**  
Biomechanical properties of human and porcine corneas.  
*Exp Eye Res*, **86** (2): 783-790
- Eule C. (2007)**  
Der Tränenfilm-Überlebensfaktor für das Auge.  
*Kleintier Konkret*, **10** (1): 14-18
- Fischbarg J. (2012)**  
Water channels and their roles in some ocular tissues.  
*Mol Aspects Med*, **33** (5-6): 638-641
- Franke W.W., Weber K., Osborn M., Schmid E., Freudenstein C. (1978)**  
Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament like arrays in various cells of epithelial character.  
*Exp Cell Res*, **116** (2): 429-445
- Franke W.W., Schiller D.L., Moll R., Winter S., Schmid E., Engelbrecht I., Denk H., Krepler R., Platzer B. (1981)**  
Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues.  
*J Mol Biol*, **153** (4): 933-959
- Freegard T. J. (1997)**  
The physical basis of transparency of the normal cornea.  
*Eye (Lond)*, **11** (Pt 4): 465-471
- Fuchs E., Cleveland D.W. (1998)**  
A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.  
*Science*, **279** (5350): 514-519
- Fujiyoshi Y., Mitsuoka K., de Groot B.L., Philippsen A., Grubmüller H., Agre P., Engel A. (2002)**  
Structure and function of water channels.  
*Curr Opin Struct Biol*, **12** (4): 509-515
- Funaki H., Yamamoto T., Koyama Y., Kondo D., Yaoita E., Kawasaki K., Kobayashi H., Sawaguchi S., Abe H., Kihara I. (1998)**  
Localization and expression of AQP5 in cornea, serous salivary glands, and pulmonary epithelial cells.  
*Am J Physiol*, **275** (4 Pt 1): C1151-C1157
- Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998a)**  
Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin.  
*J Cell Biol*, **141** (7): 1539-1550

- Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K., Tsukita S. (1998b)**  
A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts.  
*J Cell Biol*, **143** (2): 391-401
- Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. (2002)**  
Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice.  
*J Cell Biol*, **156** (6): 1099-1111
- Gaiddon J., Rosolen S.G., Steru L., Cook C.S., Pfeiffer R. Jr. (1991)**  
Use of biometry and keratometry for determining optimal power for intraocular lens implants in dogs.  
*Am J Vet Res*, **52** (5): 781-783
- Gallagher B.C. (1980)**  
Primary cilia of the corneal endothelium.  
*Am J Anat*, **159** (4): 475-484
- Gan L., Fagerholm P., Ekenbark S. (1998)**  
Expression of proliferating cell nuclear antigen in corneas kept in long term culture.  
*Acta Ophthalmol Scand*, **76** (3):308-313
- Garner A., Alexander R.A. (1986)**  
Histochemistry of elastic and related fibres in the human eye in health and disease.  
*Histochem J*, **18** (8): 405-412
- Germundsson J., Fagerholm P., Koulikovska M., Lagali N.S. (2012)**  
An accurate method to determine Bowman's layer thickness in vivo in the human cornea.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53** (4): 2354-2359
- Gershay E.L., Vidali G., Allfrey V.G. (1968)**  
Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone.  
*J Biol Chem*, **243** (19): 5018-5022
- Gilger B.C., Wright J.C., Whitley R.D., McLaughlin S.A. (1993)**  
Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats.  
*Am J Vet Res*, **54** (2): 228-230
- Giorno R. (1984)**  
A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction.  
*Diagn Immunol*, **2** (3): 161-166
- Glücksmann A. (1929)**  
Zur Entwicklung der vorderen Augenkammer, des Glaskörpers und der Hornhaut beim Menschen, bei einigen Säugern und Sauropsiden.  
*Z Anat*, **88** (5-6): 529-610
-

- Goldsworthy T.L., Butterworth B.E., Maronpot R.R.** (1993)  
Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis.  
*Environ Health Perspect*, **101** (Suppl 5): 59-66
- Gordon M.K., Hahn R.A.** (2010)  
Collagens.  
*Cell Tissue Res*, **339** (1): 247-257
- Gosline J.M.** (1978)  
Hydrophobic interaction and a model for the elasticity of elastin.  
*Biopolymers*, **17** (3): 677-695
- Grau H.** (1960)  
Das Sehorgan.  
In: Krölling O., Grau H. (Hrsg.): Lehrbuch der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere  
**10.** Auflage, *Paul Parey, Berlin und Hamburg*: 506-530
- Gum G.G., Gelatt K.N., Esson D.W.** (2013)  
Physiology of the eye.  
In: Gelatt K.N., Gilger B.C., Kern T.J. (Hrsg.): Veterinary Ophthalmology  
**5.** Auflage, *Wiley-Blackwell*: 171-207
- Günzel D., Yu A.S.** (2013)  
Claudins and the modulation of tight junction permeability  
*Physiol Rev*, **93** (2): 525-569
- Gurley L.R., D'Anna J.A., Barham S.S., Deaven L.L., Tobey R.A.** (1978)  
Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells.  
*Eur J Biochem*, **84** (1): 1-15
- Gwin R.M., Lerner I., Warren J.K., Gum G.** (1982)  
Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **22** (2): 267-271
- Haberich F.J., Lingelbach B.** (1982)  
Kritische Übersicht über unsere Kenntnisse und Vorstellungen einer neuen Arbeitshypothese über die Stabilität des präkornealen Tränenfilms (PKTF).  
*Klin Monbl Augenheilkd*, **180** (2): 115-126
- Hahnel C., Somodi S., Weiss D.G., Guthoff R.F.** (2000)  
The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy.  
*Cornea*, **19** (2): 185-193

- Hake S.B., Garcia B.A., Duncan E.M., Kauer M., Dellaire G., Shabanowitz J., Bazett-Jones D.P., Allis C.D., Hunt D.F.** (2006)  
Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants.  
*J Biol Chem*, **281** (1): 559-568
- Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., Yu C.C., Kellock D.B., Watkins J.A., Barnes D.M., Gillett C.E., Camplejohn R., Dover R., Waseem N.H., Lane D.P.** (1990)  
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms.  
*J Pathol*, **162** (4): 285-294
- Hamann S., Zeuthen T., La Cour M., Nagelhus E.A., Ottersen O.P., Agre P., Nielsen S.** (1998)  
Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye.  
*Am J Physiol*, **274** (5 Pt 1): C1332-C1345
- Hanggi E.B., Ingersoll J.F.** (2012)  
Lateral vision in horses: a behavioral investigation.  
*Behav Process*, **91** (1): 70-76
- Hanna C., Bicknell D.S., O'Brien J.E.** (1961)  
Cell turnover in the adult human eye.  
*Arch Ophthalmol*, **65**: 695-698
- Hart W.M.** (1947)  
Hydration and transparency of the cornea.  
*Am J Ophthalmol*: **30** (8): 1022-1024
- Hassell J.R., Birk D.E.** (2010)  
The molecular basis of corneal transparency.  
*Exp Eye Res*: **91** (3): 326-335
- Hatami-Marbini H., Etebu E.** (2013)  
Hydration dependent biomechanical properties of the corneal stroma.  
*Exp Eye Res*, **116**: 47-54
- Hatzfeld M., W.W. Franke** (1985)  
Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides.  
*J Cell Biol*, **101** (5 Pt 1): 1826-1841
- Hay E.D.** (1980)  
Development of the vertebrate cornea.  
*Int Rev Cytol*, **63**: 263-322

- Hayashi S., Osawa T., Tohyama K.** (2002)  
Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians.  
*J Morphol*, **254** (3): 247-258
- He J., Bazan N.G., Bazan H.E.** (2010)  
Mapping the entire human corneal nerve architecture.  
*Exp Eye Res*, **91** (4): 513-523
- Helfand B.T., Chang L., Goldman R.D.** (2004)  
Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture.  
*J Cell Sci*, **117** (Pt 2): 133-141
- Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D.** (1997)  
Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation.  
*Chromosoma*, **106** (6): 348-360
- Hendzel M.J., Nishioka W.K., Raymond Y., Allis C.D., Bazett-Jones D.P., Th'ng J.P.** (1998)  
Chromatin condensation is not associated with apoptosis.  
*J Biol Chem*, **273** (38): 24470-24478
- Hirano K., Kobayashi M., Kobayashi K., Hoshino T., Awaya S.** (1991)  
Age-related changes of microfibrils in the cornea and trabecular meshwork of the human eye.  
*Jpn J Ophthalmol*, **35** (2): 166-174
- Hiraoka M., Shimamura M.** (1977)  
Neural mechanisms of the corneal blinking reflex in cats.  
*Brain Res*, **125** (2): 265-275
- Hodson S., O'Leary D., Watkins S.** (1991)  
The measurement of ox corneal swelling pressure by osmometry.  
*J Physiol*, **434**: 399-408
- Hollwich F.** (1968)  
In: Hollwich F. (Hrsg.): Einführung in die Augenheilkunde.  
6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 3
- Holly F.J., Lemp M.A.** (1977)  
Tear physiology and dry eyes.  
*Surv Ophthalmol*, **22** (2): 69-87
- Hooper J.A., Smith E.L.** (1973)  
Histone 3. II. Isolation and sequences of chymotryptic peptides from calf thymus histone 3.  
*J Biol Chem*, **248** (9): 3255-3260
-

- Horridge G.A., Tamm S.L.** (1969)  
Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion.  
*Science*, **163** (3869): 817-818
- Hsu S.M., Raine L., Fanger H.** (1981)  
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.  
*J Histochem Cytochem*, **29** (4): 577-580
- Hsueh Y.J., Wang D.Y., Cheng C.C., Chen J.K.** (2004)  
Age-related expression of p63 and other keratinocyte stem cell markers in rat cornea.  
*J Biomed Sci*, **11** (5): 641-651
- Inagaki E., Hatou S., Yoshida S., Miyashita H., Tsubota K., Shimmura S.** (2013)  
Expression and distribution of claudin subtypes in human corneal endothelium.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **54** (12): 7258-7265
- Inai T., Kobayashi J., Shibata Y.** (1999)  
Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells.  
*Eur J Cell Biol*, **78** (12): 849-855
- Isnard N., Thévenin D., Robert L., Renard G.** (2004)  
Tropoelastin biosynthesis by corneal cells. Epithelial inhibition of keratocyte tropoelastin biosynthesis.  
*Ophthalmologica*, **218** (1): 36-42
- Jacobsen I.E., Jensen O.A., Prause J.U.** (1984)  
Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking.  
*Acta Ophthalmol (Copenh.)*, **62** (1):39-53
- Jakus M.A.** (1956)  
Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane.  
*J Biophys Biochem Cytol*, **2** (4 Suppl): 243-252
- Jester J.V., Moller-Pedersen T., Huang J., Sax C.M., Kays W.T., Cavangh H.D., Petroll W.M., Piatigorsky J.** (1999)  
The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'.  
*J Cell Sci*, **112** (Pt 5): 613-622
- Johnson D.H., Bourne W.M., Campbell R.J.** (1982)  
The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas.  
*Arch Ophthalmol*, **100** (12): 1942-1947
- Jónsson Z.O., Podust V.N., Podust L.M., Hübscher U.** (1995)  
Tyrosine 114 is essential for the trimeric structure and the functional activities of human proliferating cell nuclear antigen.  
*EMBO J*, **14** (22): 5745-5751

- Joyce N.C.** (2012)  
Proliferative capacity of corneal endothelial cells.  
*Exp Eye Res*, **95** (1): 16-23
- Juan G., Traganos F., James W.M., Ray J.M., Roberge M., Sauve D.M., Anderson H., Darzynkiewicz Z.** (1998)  
Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and Mitosis.  
*Cytometry*, **32** (2): 71-77
- Jung J.S., Preston G.M., Smith B.L., Guggino W.B., Agre P.** (1994)  
Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model.  
*J Biol Chem*, **269** (20): 14648-14654
- Junqueira L.C., Carneiro J.** (1986)  
Bindegewebe.  
In: Schiebler T.H, Peiper U., Schneider F. (Hrsg.): Histologie  
2. Auflage, Springer Verlag- Berlin, Heidelberg: 126-152
- Kaelin W.G. Jr.** (1999)  
The emerging p53 gene family.  
*J Natl Cancer Inst*, **91** (7): 594-598
- Kafarnik C., Fritsche J., Reese S.** (2007)  
In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds.  
*Vet Ophthalmol*, **10** (4): 222-230
- Kaji Y., Amano S., Usui T., Suzuki K., Tanaka S., Oshika T., Nagai R., Horiuchi S.** (2001)  
Advanced glycation end products in Descemet's membrane and their effect on corneal endothelial cell.  
*Curr Eye Res*, **23** (6): 469-477
- Kamma-Lorger C.S., Boote C., Hayes S., Moger J., Burghammer M., Knupp C., Quantock A.J., Sorensen T., Di Cola E., White N., Young R.D., Meek K.M.** (2010)  
Collagen and mature elastic fibre organisation as a function of depth in the human cornea and limbus.  
*J Struct Biol*, **169** (3): 424-430
- Kang G.-M., Ko M.K.** (2005)  
Morphological characteristics and intercellular connections of corneal keratocytes.  
*Korean J Ophthalmol*, **19** (3): 213-218
- Kao W.W., Liu C.-Y., Converse R.L., Shiraishi A., Kao C.W., Ishizaki M., Doetschman T., Duffy J.** (1996)  
Keratin 12-deficient mice have fragile corneal epithelia.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **37** (12): 2572-2584

**Kapoor R., Bornstein P., Sage E.H. (1986)**

Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain.

*Biochemistry*, **25** (13): 3930-3937

**Kapoor R., Sakai L.Y., Funk S., Roux E., Bornstein P., Sage E.H. (1988)**

Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices.

*J Cell Biol*, **107** (2): 721-730

**Karasawa K., Tanaka A., Jung K., Matsuda A., Okamoto N., Oida K., Ohmori K., Matsuda H. (2011)**

Patterns of aquaporin expression in the canine eye.

*Vet J*, **190** (2): e72-e77

**Karp G. (2005)**

Cytoskelett und Zellbewegung.

In: Karp G. (Hrsg.): Molekulare Zellbiologie

1. deutsche Auflage, *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg*: 420-490

**Kasper M., Moll R., Stosiek P., Karsten U. (1988)**

Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye.

*Histochemistry*, **89** (4): 369-377

**Kenyon K.R. (1979)**

Anatomy and pathology of the ocular surface.

*Int Ophthalmol Clin*, **19** (2): 3-35

**Kittelberger R., Davis P.F., Flynn D.W., Greenhill N.S. (1990)**

Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study.

*Connect Tissue Res*, **24** (3-4): 303-318

**Klenkler B., Sheardown H., Jones L. (2007)**

Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology.

*Ocul Surf*, **5** (3): 228-239

**Klyce S.D., Crosson C.E. (1985)**

Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review.

*Curr Eye Res*, **4** (4): 323-331

**Knop E., Knop N. (2007)**

Anatomy and immunology of the ocular surface.

*Chem Immunol Allergy*, **92**: 36-49

**Koch T., Berg R. (1993)**

Lichtsinneseorgan oder Sehorgan, Organum visus.

In: Koch T., Berg R. (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Anatomie

*Gustav Fischer Verlag, Jena*: 514-524



- Kolb G.M.** (1991)  
Systeme der Aufnahme und Weiterleitung von Informationen.  
In: Kolb G.M. (Hrsg.): Vergleichende Histologie  
*Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*: 151-163
- König H.E., Liebich H.-G., Červený C.** (2005)  
Nervensystem (Systema nervosum).  
In: König H.E., Liebich H.-G. (Hrsg.): Anatomie der Haussäugetiere  
3. Auflage, *Schattauer Verlag, Stuttgart – New York*: 485-556
- Kraff C.R., Robin J.B.** (1989)  
Normal corneal topography.  
In: Schanzlin D.J., Robin J.B. (Hrsg.): Corneal topography- measuring and modifying the cornea  
*Springer Verlag, New York*: 4-10
- Krishna T.R., Kong X.-P., Gary S., Burgers P.M., Kuriyan J.** (1994)  
Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA.  
*Cell*, **79** (7): 1233-1243
- Labermeier U., Kenney M.C.** (1983)  
The presence of EC collagen and type IV collagen in bovine Descemet's membranes.  
*Biochem Biophys Res Commun*, **116** (2): 619-625
- Ladstein R.G., Bachmann I.M., Straume O., Akslen L.A.** (2010)  
Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as prognostic factor in thick cutaneous melanoma.  
*BMC Cancer*, **10**: 140
- Laing R.A., Sandstrom M.M., Berrospi A.R., Leibowitz H.M.** (1976)  
Changes in the corneal endothelium as a function of age.  
*Exp Eye Res*, **22** (6): 587-594
- Langbein L., Grund C., Kuhn C., Praetzel S., Kartenbeck J., Brandner J.M., Moll I., Franke W.W.** (2002)  
Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom.  
*Eur J Cell Biol*, **81** (8): 419-435
- Lazarides E.** (1982)  
Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins.  
*Annu Rev Biochem*, **51**: 219-250
- Ledbetter E.C., Scarlett J.M.** (2009)  
In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus.  
*Vet Ophthalmol*, **12** (Suppl 1): 57-64

- Lehrer M.S., Sun T.-T., Lavker R.M.** (1998)  
Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation.  
*J Cell Sci*, **111** (Pt 19): 2867-2875
- Lemp M.A., Blackman H.J.** (1981)  
Ocular surface defense mechanisms.  
*Ann Ophthalmol*, **13** (1): 61-63
- Levin M.H., Verkman A.S.** (2004)  
Aquaporin-dependent water permeation at the mouse ocular surface: in vivo microfluorimetric measurements in cornea and conjunctiva.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45** (12): 4423-4432
- Levy S.G., Moss J., Sawada H., Dopping-Hepenstal P.J., McCartney A.C.** (1996)  
The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased Descemet's membrane.  
*Curr Eye Res*, **15** (1): 45-52
- Li B., Daggett V.** (2002)  
Molecular basis for the extensibility of elastin.  
*J Muscle Res Cell Motil*, **23** (5-6): 561-573
- Li W., Hayashida Y., Chen Y.-T., Tseng S.C.** (2007)  
Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus.  
*Cell Res*, **17** (1): 26-36
- Liebich H.-G., König H.E.** (2005)  
Sehorgan (Organum visus).  
In: König H.E., Liebich H.-G. (Hrsg.): Anatomie der Haussäugetiere  
**3.** Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart – New York: 567-571
- Liebich H.-G.** (2010)  
Sinnesorgane (Organa sensuum).  
In: Liebich H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere  
**5.** Auflage, Schattauer, Stuttgart- New York: 369-404
- Linsenmayer T.F., Fitch J.M., Mayne R.** (1984)  
Extracellular matrices in the developing avian eye: type V collagen in corneal and noncorneal tissues.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **25** (1): 41-47
- Little N.A., Jochemsen A.G.** (2002)  
p63.  
*Int J Biochem Cell Biol*, **34** (1): 6-9
- MacCallum D.K., Bahn C.F., Lillie J.H., Meyer R.F., Martonyi C.L.** (1983)  
Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **24** (2): 247-250

- Macnamara E., Sams G.W., Smith K., Ambati J., Singh N., Ambati B.K.** (2004)  
Aquaporin-1 expression is decreased in human and mouse corneal endothelial dysfunction.  
*Mol Vis*, **10**: 51-56
- Maeda Y., Smith B.L., Agre P., Knepper M.A.** (1995)  
Quantification of the Aquaporin-CHIP water channel protein in microdissected renal tubules by fluorescence-based ELISA.  
*J Clin Invest*, **95** (1): 422-428
- Magin T.M., Vijayarai P., Leube R.E.** (2007)  
Structural and regulatory functions of keratins.  
*Exp Cell Res*, **313** (10): 2021-2032
- Magrane W.G.** (1971a)  
Diseases and surgery of the lids and lacrimal apparatus.  
In: Magrane W.G. (Hrsg.): Canine ophthalmology  
2. Auflage, *Lea & Febiger, Philadelphia*: 52-79
- Magrane W.G.** (1971b)  
The normal eye.  
In: Magrane W.G. (Hrsg.): Canine ophthalmology  
2. Auflage, *Lea & Febiger, Philadelphia*: 1-8
- Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoudé G.A., Barrandon Y.** (2008)  
Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface.  
*Nature*, **456** (7219): 250-254
- Mandell R.B., Fatt I.** (1965)  
Thinning of the human cornea on awakening.  
*Nature*, **208** (5007): 292-293
- Marks D.B., Paik W.K., Borun T.W.** (1973)  
The relationship of histone phosphorylation to deoxyribonucleic acid replication and mitosis during the HeLa S-3 cell cycle.  
*J Biol Chem*, **248** (16): 5660-5667
- Marshall G.E., Konstas A.G., Lee W.R.** (1993)  
Collagens in ocular tissues.  
*Br J Ophthalmol*, **77** (8): 515-524
- Mathews M.B., Bernstein R.M., Franza B.R. Jr., Garrels J.I.** (1984)  
Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin.  
*Nature*, **309** (5966): 374-376
- Maurice D.M.** (1957)  
The structure and transparency of the cornea.  
*J Physiol*, **136** (2): 263-286

- Meek K.M., Fullwood N.J.** (2001)  
Corneal and sclera collagens--a microscopist's perspective.  
*Micron*, **32** (3): 261-272
- Meinild A.-K., Klaerke D.A., Zeuthen T.** (1998)  
Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5.  
*J Biol Chem*, **273** (49): 32446-32451
- Merindano M.D., Canals M., Potau J.M., Costa J., Ruano D.** (1997)  
Morphological and morphometric aspects of primate cornea: a comparative study with human cornea.  
*Eur J Morphol*, **35** (2): 95-104
- Merindano M.D., Costa J., Canals M., Potau J.M., Ruano D.** (2002)  
A comparative study of Bowman's layer in some mammals: relationship with other constituent corneal structures.  
*Eur J Anat*, **6** (3):133-139
- Michel G.** (1992)  
Sinnesorgane.  
In: Smollich A., Michel G. (Hrsg.): Mikroskopische Anatomie der Haustiere  
2. Auflage, *Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart*: 451-543
- Moll R., Divo M., Langbein L.** (2008)  
The human keratins: biology and pathology.  
*Histochem Cell Biol*, **129** (6): 705-733
- Morita K., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S.** (1999)  
Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, **96** (2): 511-516
- Morita M., Fujita N., Takahashi A., Nam E.R., Yui S., Chung C.S., Kawahara N., Lin H.Y., Tsuzuki K., Nakagawa T., Nishimura R.** (2014)  
Evaluation of ABCG2 and p63 expression in canine cornea and cultivated corneal epithelial cells.  
*Vet Ophthalmol*, doi: 10.1111/vop.12147
- Moriyama H., Kasashima Y., Kuwano A., Wada S.** (2013)  
Anatomical location and culture of equine corneal epithelial stem cells.  
*Vet Ophthalmol*, **17** (2): 106-112
- Mulisch M., Welsch U.** (2010)  
In: Romeis (Hrsg.): Mikroskopische Technik  
18. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Müller L.J., Pels L., Vrensen G.F.** (1995)  
Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36** (13): 2557-2567
-

**Müller L.J., Pels E., Vrensen G.F. (2001)**

The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature.

*Br J Ophthalmol*, **85** (4): 437-443

**Müller L.J., Marfurt C.F., Kruse F., Tervo T.M. (2003)**

Corneal nerves: structure, contents and function.

*Exp Eye Res*, **76** (5): 521-542

**Muragaki Y., Mattei M.-G., Yamaguchi N., Olsen B.R., Ninomiya Y. (1991)**

The complete primary structure of the human alpha 1(VIII) chain and assignment of its gene (COL8A1) to chromosome 3.

*Eur J Biochem*, **197** (3): 615-622

**Murphy C.J., Bellhorn R.W., Williams T., Burns M.S., Schaeffel F., Howland H.C. (1990)**

Refractive state, ocular anatomy, and accommodative range of the sea otter (*Enhydra lutris*).

*Vision Res*, **30** (1): 23-32

**Murphy C.J., Kern T.J., Howland H.C. (1992)**

Refractive state, corneal curvature, accommodative range and ocular anatomy of the Asian elephant (*Elephas maximus*).

*Vision Res*, **32** (11): 2013-2021

**Nagle R.B. (1994)**

A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis.

*Mol Biol Rep*, **19** (1): 3-21

**Nasr M.R., El-Zammar O. (2008)**

Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions.

*Am J Dermatopathol*, **30** (2): 117-122

**Newsome D.A. (1979)**

Embryology and biology of the ocular surface.

*Int Ophthalmol Clin*, **19** (2): 53-72

**Nichols B., Dawson C.R., Togni B. (1983)**

Surface features of the conjunctiva and cornea.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **24** (5): 570-576

**Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (2004)**

Sehorgan, Organum visus.

In: Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere IV

4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart: 405-440

**Oda Y., Fukuda S.** (1962)

Electron microscopic studies on the animals cornea: I. Bowman's membran and basement membrane of the dog and monkey corneas.  
*J Electron Microsc (Tokyo)*, **11** (3): 179-184

**Ofri R.** (2013)

Optics and physiology of vision.  
In: Gelatt K.N., Gilger B.C., Kern T.J. (Hrsg.): *Veterinary Ophthalmology*  
**5.** Auflage, *Wiley-Blackwell*: 208-270

**O'Rahilly R., Meyer D.B.** (1959)

The early development of the eye in the chick *Gallus domesticus* (stages 8 to 25).  
*Acta anat (Basel)*, **36**(1-2): 20-58

**Oxlund H., Manschot J., Viidik A.** (1988)

The role of elastin in the mechanical properties of skin.  
*J Biomech*, **21** (3): 213-218

**Pansky B.** (1982)

The eye: lens, choroid, sclera, cornea and optic nerve.  
In: Pansky B. (Hrsg.): *Review of medical embryology*  
**1.** Auflage, *Macmillan, New York*: 168

**Parsa R., Yang A., McKeon F., Green H.** (1999)

Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes.  
*J Invest Dermatol*, **113** (6):1099-1105

**Patil R.V., Saito I., Yang X., Wax M.B.** (1997)

Expression of aquaporins in the rat ocular tissue.  
*Exp Eye Res*, **64** (2): 203-209

**Pauklin M., Thomasen H., Pester A., Steuhl K.-P., Meller D.** (2011)

Expression of pluripotency and multipotency factors in human ocular surface tissues.  
*Curr Eye Res*, **36** (12): 1086-1097

**Pedler C.** (1962)

The fine structure of the corneal epithelium.  
*Exp Eye Res*, **1**: 286-289

**Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., McKeon F., De Luca M.** (2001)

P63 identifies keratinocyte stem cells.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, **98** (6): 3156-3161

**Pfister R.R.** (1973)

The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study.  
*Invest Ophthalmol*, **12** (9): 654-668

- Pitz S., Moll R.** (2002)  
Intermediate-filament expression in ocular tissue.  
*Prog Retin Eye Res*, **21** (2): 241-262
- Polack F.M.** (1961)  
Morphology of the cornea. I. Study with silver stains.  
*Am J Ophthalmol*, **51**: 1051-1056
- Poole C.A., Brookes N.H., Clover G.M.** (1993)  
Keratocyte networks visualized in the living cornea using vital dyes.  
*J Cell Sci*, **106** (Pt 2): 685-691
- Potter T.J., Hallowell G.D., Bowen I.M.** (2008)  
Ultrasonographic anatomy of the bovine eye.  
*Vet Radiol Ultrasound*, **49** (2): 172-175
- Pouliquen Y., Faure J.P., Bisson J., Offret G.** (1966)  
The subepithelial acellular fibrillar zone of the cornea of the embryo. Its relation to the formation of the epithelial basal membrane and Bowman's membrane.  
*Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol*, **26** (1): 59-68
- Prelich G., Tan C.-K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B.** (1987)  
Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase-delta auxiliary protein.  
*Nature*, **326** (6112): 517-520
- Preston G.M., Agre P.** (1991)  
Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family.  
*Proc Nat Acad Sci USA*, **88** (24): 11110-11114
- Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B., Agre P.** (1994)  
Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitopic-scanning mutants by vectorial proteolysis.  
*J Biol Chem*, **269** (3): 1668-1673
- Puk O., Dalke C., Calzada-Wack J., Ahmad N., Klaften M., Wagner S., de Angelis M.H., Graw J.** (2009)  
Reduced corneal thickness and enlarged anterior chamber in a novel ColVIIIa2G257D mutant mouse.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50** (12): 5653-5661
- Radner W., Zehetmayer M., Aufreiter R., Mallinger R.** (1998)  
Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea.  
*Cornea*, **17** (5): 537-543

- Raju K., Anwar R.A.** (1987)  
Primary structures of bovine elastin a, b and c deduced from the sequences of cDNA clones.  
*J Biol Chem*, **262** (12): 5755-5762
- Ren G., Cheng A., Reddy V., Melnyk P., Mitra A.K.** (2000)  
Three-dimensional fold of the human AQP1 water channel determined at 4 Å resolution by electron crystallography of two-dimensional crystals embedded in ice.  
*J Mol Biol*, **301** (2): 369-387
- Ribalta T., McCutcheon I.E., Aldape K.D., Bruner J.M., Fuller G.N.** (2004)  
The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas according to WHO 2000 criteria.  
*Am J Surg Pathol*, **28** (11): 1532-1536
- Ribeiro A.P., Piso D.Y., Padua I.R., Silva M.L., Laus J.L.** (2010)  
Intraocular pressure and tear secretion in Saanen goats with different ages.  
*Pesq Vet Bras*, **30** (9): 798-802
- Rodrigues G.N., Laus J.L., Santos J.M., Rigueiro M.P., Smith R.L.** (2006)  
Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages.  
*Vet Ophthalmol*, **9** (2): 101-107
- Rodriguez-Boulan E., Nelson W.J.** (1989)  
Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype.  
*Science*, **245** (4919): 718-725
- Rodriguez-Ramos Fernandez J., Dubielzig R.R.** (2013)  
Ocular comparative anatomy of the familiy Rodentia.  
*Vet Ophthalmol*, **16** (Suppl 1):94-99
- Rojek A., Praetorius J., Frøkiaer J., Nielsen S., Fenton R.A.** (2008)  
A current view of the mammalian aquaglyceroporins.  
*Annu Rev Physiol*, **70**: 301-327
- Rolando M., Zierhut M.** (2001)  
The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease.  
*Surv Ophthalmol*, **45** (Suppl 2): S203-S210
- Romer A.S.** (1966)  
Sinnesorgane- Das Auge.  
In: Romer A. S.: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere  
2. Auflage, Verlag Paul Parey, Hamburg- Berlin: 385-395
- Rózsa A.J., Beuerman R.W.** (1982)  
Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit.  
*Pain*, **14** (2): 105-120



**Ruiz-Ederra J., García M., Hernández M., Urcola H., Hernández-Barbáchano E., Araiz J., Vecino E. (2005)**

The pig eye as a novel model of glaucoma.  
*Exp Eye Res*, **81** (5): 561-569

**Sage H., Gray W.R. (1980)**

Studies on the evolution of elastin. II. Histology.  
*Comp Biochem Physiol*, **66** (1): 13-22

**Sage H., Pritzl P., Bornstein P. (1980)**

A unique, pepsin-sensitive collagen synthesized by aortic endothelial cells in culture.  
*Biochemistry*, **19** (25): 5747-5755

**Sage H., Trüeb B., Bornstein P. (1983)**

Biosynthetic and structural properties of endothelial cell type VIII collagen.  
*J Biol Chem*, **258** (21): 13391-13401

**Salehi-Had H., Alvarenga L.S., Isseroff R., Schwab I.R. (2005)**

Factors modulating p63 expression in cultured limbal epithelial cells.  
*Cornea*, **24** (7): 845-852

**Samuelson D.A. (2013)**

Ophthalmic anatomy.  
In: Gelatt K.N., Gilger B.C., Kern T.J. (Hrsg.): *Veterinary Ophthalmology*  
**5. Auflage, Wiley-Blackwell**: 39-170

**Sawada H. (1982)**

The fine structure of the bovine Descemet's membrane with special reference to biochemical nature.  
*Cell Tissue Res*, **226** (2): 241-255

**Sawada H., Konomi H., Hirosawa K. (1990)**

Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen.  
*J Cell Biol*, **110** (1): 219-227

**Sawaf M.H., Ouhayoun J.P., Shabana A.H., Forest N. (1992)**

Cytokeratins, markers of epithelial cell differentiation: expression in normal epithelia.  
*Pathol Biol (Paris)*, **40** (6): 655-665

**Schermer A., Galvin S., Sun T.-T. (1986)**

Differentiation-related expression of major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells.  
*J Cell Biol*, **103** (1): 49-62

**Schlegel T. (2000)**

Vergleichende Untersuchungen zur Anatomie des dritten Augenlids der Haussäugetiere.  
*Vet med Diss, Ludwig-Maximilians-Universität München*

- Schlegel T., Brehm H., Amselgruber W.M.** (2003)  
IgA and secretory component (SC) in the third eyelid of domestic animals: a comparative study.  
*Vet Ophthalmol*, **6** (2): 157-161
- Schmidt V.** (1988)  
Krankheiten der Hornhaut.  
In: Schmidt V.: Augenkrankheiten der Haustiere  
2. Auflage, *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*: 119-146
- Schnorr B.** (1985)  
IV. Entwicklung der Sinnesorgane.  
In: Schnorr B. (Hrsg.): Embryologie der Haustiere  
1. Auflage, *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*: 124-128
- Sherrard E.S., Ng Y.L.** (1990)  
The other side of the corneal endothelium.  
*Cornea*, **9** (1): 48-54
- Shively J.N., Epling G.P.** (1970)  
Fine structure of the canine eye: cornea.  
*Am J Vet Res*, **31** (4): 713-722
- Shuttleworth C.A.** (1997)  
Type VIII collagen.  
*Int J Biochem Cell Biol*, **29** (10): 1145-1148
- Sinowatz F.** (1991)  
Sinnesorgane.  
In: Rüsse I., Sinowatz F. (Hrsg.): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere  
1. Auflage, *Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg*: 287-295
- Sosnová-Netuková M., Kuchynka P., Forrester J.V.** (2007)  
The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes.  
*Br J Ophthalmol*, **91** (3): 372-378
- Sótonyi P.** (2010)  
Anatomie und Physiologie.  
In: Tóth J., Hollerrieder J., Sótonyi P. (Hrsg.): Augenheilkunde beim Pferd  
*Schattauer Verlag, Stuttgart – New York*: 3-21
- Sui H., Han B.-G., Lee J.K., Walian P., Jap B.K.** (2001)  
Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel.  
*Nature*, **414** (6866): 872-878
- Sundström B.E., Stigbrand T.I.** (1994)  
Cytokeratins and tissue polypeptide antigen.  
*Int J Biol Markers*, **9** (2): 102-108

- Takasaki Y., Deng J.-S., Tan E.M.** (1981)  
A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation.  
*J Exp Med*, **154** (6): 1899-1909
- Tamura Y., Konomi H., Sawada H., Takashima S., Nakajima A.** (1991)  
Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32** (9): 2636-2644
- Telgen L.H.** (2009)  
Antimikrobielle Proteine und Abwehrzellen im weiblichen Genitale beim Schwein –  
Eine histologische und immunhistochemische Studie.  
*Vet med Diss, Ludwig-Maximilians-Universität München*
- Thiagarajah J.R., Verkman A.S.** (2002)  
Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration  
of transparency after swelling.  
*J Biol Chem*, **277**(21): 19139-19144
- Tripathi R.C., Raja S.C., Tripathi B.J.** (1990)  
Prospects for epidermal growth factor in the management of corneal disorders.  
*Surv Ophthalmol*, **34** (6): 457-462
- Tseng S.C., Jarvinen M.J., Nelson W.G., Huang J.-W., Woodcock-Mitchell J., Sun T.-T.**  
(1982)  
Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation:  
monoclonal antibody studies.  
*Cell*, **30** (2): 361-372
- Tsukita S., Furuse M.** (1999)  
Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?  
*Trends Cell Biol*, **9** (7): 268-273
- Tsukita S., Furuse M., Itoh M.** (2001)  
Multifunctional strands in tight junctions.  
*Nat Rev Mol Cell Biol*, **2** (4): 285-293
- Tuft S.J., Coster D.J.** (1990)  
The corneal endothelium.  
*Eye (Lond)*, **4** (Pt 3): 389-424
- Uehara K., Miyoshi M., Miyoshi S.** (1991)  
Cytoskeleton in microridges of the oral mucosal epithelium in the carp, *Cyprinus*  
*carpio*.  
*Anat Rec*, **230** (2): 164-168
- Urry D.W., Parker T.M.** (2002)  
Mechanics of elastin: molecular mechanism of biological elasticity and its relationship  
to contraction.  
*J Muscle Res Cell Motil*, **23** (5-6): 543-559

- Van Buskirk E.M.** (1989)  
The anatomy of the limbus.  
*Eye (Lond)*, **3** (Pt 2): 101-108
- Verkman A.S.** (2003)  
Role of aquaporin water channels in eye function.  
*Exp Eye Res*, **76** (2): 137-143
- Verkman A.S.** (2005)  
More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins.  
*J Cell Sci*, **118** (Pt 15): 3225-3232
- Walde I., Nell B., Schäffer E.H., Köstlin R.G.** (2008)  
Embryologische, anatomische und physiologische Vorbemerkungen.  
In: Walde I., Nell B., Schäffer E.H., Köstlin R.G. (Hrsg.): *Augenheilkunde- Lehrbuch und Atlas*  
**3.** Auflage, *Schattauer Verlag, Stuttgart – New York*: 3-43
- Wang Y., Chen M., Wolosin J.M.** (1993)  
ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal.  
  
*Exp Eye Res*, **57** (3): 283-292
- Wang D.-Y., Cheng C.-C., Kao M.-H., Hsueh Y.-J., Ma D.H., Chen J.-K.** (2005)  
Regulation of limbal keratinocyte proliferation and differentiation by TAP63 and DeltaNp63 transcription factors.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46** (9): 3102-3108
- Waseem N.H., Lane D.P.** (1990)  
Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Structural conservation and the detection of a nucleolar form.  
*J Cell Sci*, **96** (Pt 1): 121-129
- Wei Z.-G., Wu R.-L., Lavker R.M., Sun T.-T** (1993)  
In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **34** (5): 1814-1828
- Wen Q., Diecke F.P., Iserovich P., Kuang K., Sparrow J., Fischbarg J.** (2001)  
Immunocytochemical localization of aquaporin-1 in bovine corneal endothelial cells and keratocytes.  
*Exp Biol Med (Maywood)*, **226** (5): 463-467
- Wiedemann S.M., Mildner S.N., Bönisch C., Israel L., Maiser A., Matheis S., Straub T., Merkl R., Leonhardt H., Kremmer E., Schermelleh L., Hake S.B.** (2010)  
Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X und H3.Y.  
*J Cell Biol*, **190** (5): 777-791

- Wiley L., SundarRaj N., Sun T.-T., Thoft R.A.** (1991)  
Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32** (3): 594-602
- Woodrow D.F., Shore I., Moss J., Gower P., Phillips M.** (1989)  
Immunoelectron microscopic studies of immune complex deposits and basement membrane components in IgA nephropathy.  
*J Pathol*, **157** (1): 47-57
- Wrenn D.S., Griffin G.L., Senior R.M., Mecham R.P.** (1986)  
Characterization of biologically active domains on elastin: identification of a monoclonal antibody to a cell recognition site.  
*Biochemistry*, **25** (18): 5172-5176
- Yamada M., Mashima Y.** (1995)  
The role of the basal cell layer in the maintenance of normal corneal epithelium.  
*Nihon Ganka Gakkai Zasshi*, **99** (1): 3-9
- Yamaguchi N., Mayne R., Ninomiya Y.** (1991)  
The alpha 1(VIII) collagen gene is homologous to the alpha 1(X) collagen gene and contains a large exon encoding the entire triple helical and carboxyl-terminal non-triple helical domains of the alpha 1(VIII) polypeptide.  
*J Biol Chem*, **266** (7): 4508-4513
- Yamaguchi K., Stell W.K.** (1994)  
Quantitative analyses by radioimmunoassay of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in ocular tissues.  
*Jpn J Ophthalmol*, **38** (1): 24-29
- Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dötsch V., Andrews N. C., Caput D., McKeon F.** (1998)  
p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities.  
*Mol Cell*, **2** (3): 305-316
- Yang A., Schweiter R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C., McKeon F.** (1999)  
p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development.  
*Nature*, **398** (6729): 714-718
- Yang G.G.** (2011)  
Phosphohistone H3: new standard IHC marker for grading tumors via mitotic indexing.  
*MLO Med Lab Obs*, **43** (7): 20-23
- Yi X., Wang Y., Yu F.-S.** (2000)  
Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41** (13): 4093-4100

**Yi D.H., Dana M.R.** (2002)

Corneal edema after cataract surgery: incidence and etiology.  
*Semin Ophthalmol*, **17** (3-4): 110-114

**Yoshida Y., Ban Y., Kinoshita S.** (2009)

Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50** (5): 2103-2108

**Yu C.C., Woods A.L., Levison D.A.** (1992)

The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications.  
*Histochem J*, **24** (3): 121-131

**Yu D., Thelin W.R., Randell S.H., Boucher R.C.** (2012)

Expression profiles of aquaporins in rat conjunctiva, cornea, lacrimal gland and Meibomian gland.  
*Exp Eye Res*, **103**: 22-32

**Yurchenco P.D., O'Rear J.J.** (1994)

Basal lamina assembly.  
*Curr Opin Cell Biol*, **6** (5): 674-681

**Zhang D., Vetrivel L., Verkman A.S.** (2002)

Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production.  
*J Gen Physiol*, **119** (6): 561-569

**Zhang L., Wang L.** (2007)

Research of the role of aquaporins-1 in corneal endothelial fluid transport.  
*Int J Ophthalmol*, **7** (3): 632-634

**Zietzschmann O., Krölling O.** (1955)

Das Sehorgan.  
In: Zietzschmann O., Krölling O. (Hrsg.): Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere  
**2.** Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg: 260-274

**Zinn K.M., Mockel-Pohl S.** (1975)

Fine structure of the developing cornea.  
*Int Ophthalmol Clin*, **15**(1): 19-37

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

A., Aa.	Arteria, Arteriae
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
AQP	Aquaporin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CHIP	channel-forming integral protein
CK	Cytokeratin
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPD	Critical Point Dryer
DAB	Diaminobenzidin
DM	Descemetsche Membran
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Epithel
EC	endothelial collagen
et al.	et alii
Fa.	Firma
GAH	Glutaraldehyd
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gly	Glycin
H.E.	Hämatoxilin-Eosin
Hrsg.	Herausgeber
IF	Intermediärfilament
IgA	Immunglobulin A
IgG.	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
IPA	Image Processing and Analysis
IOP	intraocular pressure
i.v.	intravenös
K	Kalium
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

KET	keratinocyte transcription factor
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KOH	Kalilauge
LSAB	Labelled-Streptavidin-Biotin
Lys	Lysin
M	Messung
M.	Musculus
mA	Milliampère
µA	Mikroampère
M/E	Methanol/Eisessig
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	Millimol
MW	Mittelwert
N., Nn.	Nervus, Nervi
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na	Natrium
P	Peripherie
PAS	periodic acid Schiff's reaction
PBS	phosphate buffered saline
PC	Personal Computer
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pH	potentia Hydrogenii
PHH3	Phosphorhiston H3
Pro	Prolin
REM	Rasterelektronenmikroskop
S	Stroma
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
V., Vv.	Vena, Venae
v.a.	vor allem
Val	Valin
Z	Zentrum
z.B.	zum Beispiel



### 8.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

#### Abbildungen:

<b>Abb. 1:</b>	Schematische Darstellung der humanen Hornhautentwicklung (modifiziert nach Pansky, 1982). A: 7.Woche. B: 3. Monat. Oberflächenektoderm (Oe), Mesenchym (M), Linse (L), corneales Epithel (CEp), Augenlid (Al), verwachsene Lidkante (VLk), vordere Augenkammer (VAk), corneales Endothel (CEn).	3
<b>Abb. 2:</b>	Schematischer Querschnitt eines Augapfels (modifiziert nach Hollwich, 1968).	6
<b>Abb. 3:</b>	Schematische Einteilung der Hornhaut nach topographischen Aspekten, modifiziert nach Kraff und Robin (1989).	10
<b>Abb. 4:</b>	Querschnitt durch die Hornhaut einer Ziege. Detailaufnahmen von Epithel, Stroma und Endothel mit Descemetscher Membran (DM). Hämatoxilin-Eosin-Färbung.	34
<b>Abb. 5:</b>	Die drei Schichten des vorderen Hornhautepithels mit einer durchgehend angefärbten Basalmembran (↑) beim Hund. (a) <i>Stratum basale</i> ; (b) <i>Stratum intermedium</i> ; (c) <i>Stratum superficiale</i> ; (*) beginnende Desquamation. PAS-Reaktion.	35
<b>Abb. 6:</b>	Vergleichende Darstellung des vorderen Hornhautepithels von Katze, Hund und Pferd im Zentrum der Hornhaut. Das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel variiert tierartenspezifisch beträchtlich in der Anzahl der Zelllagen. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.	36
<b>Abb. 7:</b>	Vergleichende Darstellung des vorderen Hornhautepithels von Schwein, Ziege und Rind im Zentrum der Hornhaut. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.	37
<b>Abb. 8:</b>	Darstellung des Limbus im Vergleich bei Rind (A), Pferd (B) und Katze (C). Die Zunahme der Schichtdicke am Übergang von Hornhautepithel (*) zu Konjunktivalepithel (●) variiert tierartlich. Eine Pigmentierung (►) des Hornhautepithels ist nicht bei allen untersuchten Tierarten festzustellen. Detailaufnahme: Pigmenteinlagerungen lassen sich auch noch im <i>Stratum intermedium</i> finden. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.	39

<b>Abb. 9:</b>	Paralleler Verlauf der kollagenen Fasern im posterioren Anteil des Stromas einer Katze. Die schlanken Keratozyten (↑) liegen zwischen den dichtgepackten Kollagenfibrillen. Insert: Knapp unterhalb des Hornhautepithels weist der anteriore Anteil des Stromas eine deutlich geringere Ordnung auf. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.	40
<b>Abb. 10:</b>	Darstellung der Descemetschen Membran im tierartlichen Vergleich von Pferd (A), Rind (B), Hund (C), Ziege (D), Katze (E), Schwein (F). Die Schichtdicke nimmt von A nach F beträchtlich ab. PAS-Reaktion.	41
<b>Abb. 11:</b>	Ausschnitt aus dem Endothel von Ziege (A) und Schwein (B). Das Schwein mit seinen etwas höheren Endothelzellen weist Zellkerne mit einer zur vorderen Augenkammer (*) hin leicht konvexen Form auf. Bei der Ziege stellen sich die Zellkerne abgeplattet dar. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.	42
<b>Abb. 12:</b>	Hornhautepithel vom Schwein. Zu sehen sind mosaikartig angeordnete, polygonale Epithelzellen des <i>Stratum superficiale</i> . Durch unterschiedliche Elektronenreflexe erscheinen die Zellen in verschiedenen Graustufen. REM-Aufnahme.	43
<b>Abb. 13:</b>	Die Epitheloberfläche besitzt multiple Membran-ausstülpungen ( <i>Microvilli</i> und <i>Microplacae</i> ), die mit dem Tränenfilm in Kontakt stehen. Beim Schwein (A) sind die Ausstülpungen langgezogen, bei der Katze (B) und beim Hund (C) kurz und gewunden. Das Pferd (D) weist wie das Rind (E) sichtlich höhere Oberflächenvergrößerungen auf. Bei der Ziege (F) lassen sich kreisrunde erhabene Kringel finden. REM-Aufnahme.	44
<b>Abb. 14:</b>	Gefrierbruch der Hornhaut mit Aufsicht auf die endotheliale Oberfläche vom Rind. Die parallele, lamelläre Schichtung des Stromas ist gut zu erkennen. REM-Aufnahme.	45
<b>Abb. 15:</b>	Längsgerichteter Verlauf der kollagenen, lamellenbildenden Faserbündel im Stroma beim Schwein. Mazeration. REM-Aufnahme.	46
<b>Abb. 16:</b>	Darstellung der Descemetschen Membran mit der hexagonale Gitterstruktur beim Rind. Detailaufnahme: Kollagene Fasern verlaufen zwischen dem Gittergerüst. Mazeration. REM-Aufnahme.	47
<b>Abb. 17:</b>	Die hexagonalen Endothelzellen sind netzartig angeordnet. Beim Schwein (A) sind die Zellen erkennbar kleiner als beim Hund (B) ausgebildet (jeweils > 2 Jahre), tragen hingegen vermehrt feine <i>Microvilli</i> . Insert: Detailansicht der <i>Microvilli</i> und der verzahnten Zellgrenzen.	48

<b>Abb. 18:</b>	Verteilung von Cytokeratin 1 im zentralen Hornhautepithel des Schweines. Das Zytoplasma der anterioren Intermediär- und Oberflächenzellen ist deutlich markiert. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	49
<b>Abb. 19:</b>	Expressionsmuster von Cytokeratin 2 im vorderen Hornhautepithel. Beim Schwein (A) beschränkt sich die Expression auf die oberflächlichste Zellschicht des <i>Stratum superficiale</i> , welches sich bei der Ziege (B) komplett moderat anfärbt. Im Vergleich dazu wird bei der Katze (C) sowohl das <i>Stratum superficiale</i> als auch das <i>Stratum intermedium</i> intensiv markiert. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	51
<b>Abb. 20:</b>	Das <i>Stratum superficiale</i> des zentralen Hornhautepithels reagiert beim Rind deutlich positiv auf den immunhistochemischen Nachweis von Cytokeratin 3. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	52
<b>Abb. 21:</b>	Expression von p63 im Limbus beim Rind (A) und Hund (B). Die Expression beschränkt sich beim Rind nicht nur auf das <i>Stratum basale</i> . Insert: Zentral der Hornhaut ist die Intensität der DAB-Reaktion erkennbar geringer. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	54
<b>Abb. 22:</b>	Unterschiedlich starke Expression von mitotisch aktiven, PCNA-positiven Basalzellen des peripheren Hornhautepithels von Schwein (A) und Hund (B).	55
<b>Abb. 23:</b>	Anzahl der PCNA-positiven, epithelialen Basalzellen, ermittelt aus limbalen, peripheren und zentralen Messpunkten. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.	56
<b>Abb. 24:</b>	PHH3-positive Zelle zum Zeitpunkt der Mitose im peripheren Bereich der Hornhaut der Ziege. Typisch ist Färbung des kondensierten Chromatins sowie die Lokalisation im <i>Stratum basale</i> . DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	56
<b>Abb. 25:</b>	Tierartlich unterschiedliche Intensität der DAB-Reaktion bei Claudin-1 im Zytoplasma des Endothels, Rind (A) und Pferd (B). DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	57
<b>Abb. 26:</b>	Unterschiedliche Verteilung von Claudin-1 im Hornhautepithel. Beim Pferd (A) liegt die Expression hauptsächlich im <i>Stratum intermedium</i> . Die Lokalisation von Claudin-1 ist beim Rind (B) vermehrt im apikalen <i>Stratum intermedium</i> und <i>Stratum superficiale</i> . DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Häkalaun.	58

---

<b>Abb. 27:</b>	Immunhistochemischer Nachweis von AQP1. Die Keratozyten exprimieren bei der Ziege ( <b>A</b> ) AQP1 im posterioren Anteil des Hornhautstromas. Beim Pferd ( <b>B</b> ) werden die Keratozyten im gesamten Stroma angefärbt. Das Endothel weist sowohl bei der Ziege als auch beim Pferd eine deutlich positive Reaktion auf. Das Stroma wurde zur vergleichenden Darstellung verkleinert (- - -). DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.	59
<b>Abb. 28:</b>	AQP5 ist beim Schwein ( <b>A</b> ) nur in der äußersten Lage des <i>Stratum superficiale</i> lokalisiert, wohingegen bei der Katze ( <b>B</b> ) das gesamte Hornhautepithel AQP5 aufweist. DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.	61
<b>Abb. 29:</b>	Endothel vom Schwein mit Descemetscher Membran ( <b>►</b> ). Insert: Endothelzelle einer Katze mit zahlreichen Kollagen-Typ-VIII-positiven Granula ( <b>↑</b> ). DAB-Reaktion, Gegenfärbung mit Hämalan.	62
<b>Tabellen</b>		
<b>Tab. 1:</b>	Übersicht über die verwendeten Antikörper.	31
<b>Tab. 2:</b>	Semiquantitative Bewertung der Häufigkeit und Intensität.	33
<b>Tab. 3:</b>	Anzahl der Zelllagen im Zentrum des vorderen Hornhautepithels bei Schwein, Pferd, Rind, Ziege, Hund und Katze.	38
<b>Tab. 4:</b>	Übersicht der Expression von CK1 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).	50
<b>Tab. 5:</b>	Übersicht der Expression von CK3 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).	52
<b>Tab. 6:</b>	Übersicht der Expression von p63 in den einzelnen Abschnitten der Hornhaut. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).	53
<b>Tab. 7:</b>	Tierartlicher Vergleich der Expression von AQP1 in den einzelnen Schichten der Hornhaut. Dargestellt ist die Anzahl der positiv markierten Zellen (-- keine, +/- einzelne (< 10 %), + wenige (< 50 %), ++ (viele < 80 %), +++ zahlreiche (>80 %)).	59
<b>Tab. 8:</b>	Übersicht der Expression von AQP5 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).	60

**Tabellen im Anhang:**

<b>Tab. A1:</b>	Höhe der Hornhautschichten in $\mu\text{m}$ im tierartlichen Vergleich; ] Messwerte an je 5 verschiedenen Stellen von zentral bis peripher: Messdaten M1 bis M3.	112
	Fortsetzung: Messdaten M4 bis M5 und Mittelwert.	113
	Fortsetzung: Mittelwert gesamt und Standardabweichung.	114
<b>Tab. A2:</b>	Übersicht der Expression von CK2 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).	114
<b>Tab. A3:</b>	PCNA-positive epitheliale Basalzellen.	115
<b>Tab. A4:</b>	PHH3-positive epitheliale Basalzellen.	115

## 9 Anhang

**Tab. A1:** Höhe der Hornhautschichten in  $\mu\text{m}$  im tierartlichen Vergleich; Messwerte an je 5 verschiedenen Stellen von zentral bis peripher: Messdaten M1 bis M3.

		M1			M2			M3		
		E	S	DM	E	S	DM	E	S	DM
Katze	1. Tier	88,5	1590	36,4	99,5	1710	34,0	81,2	1720	42,1
	2. Tier	105,0	1920	21,2	107,0	1980	20,7	128,0	2090	19,4
	3. Tier	94,7	991	30,7	99,8	1010	33,8	98,2	1020	36,9
	4. Tier	90,3	1241	32,5	92,2	1279	31,4	99,8	1481	35,2
Hund	1. Tier	116,0	1530	48,3	120,0	1500	50,3	111,0	1580	54,4
	2. Tier	182,0	1280	65,1	148,0	1470	65,1	136,0	1870	66,4
	3. Tier	135,0	960	41,0	132,0	980	38,8	130,0	980	40,0
Pferd	1. Tier	304,0	1800	121,0	355,0	1770	109,0	390,0	1930	116,0
	2. Tier	256,0	884	95,8	232,0	773	94,0	250,0	892	97,2
	3. Tier	310,0	818	100,0	292,0	920	100,0	261,0	1010	98,7
	4. Tier	287,0	923	98,6	297,0	993	105,0	313,0	1211	104,0
Schwein	1. Tier	153,0	2520	21,1	151,0	2710	19,1	136,0	2730	17,0
	2. Tier	202,0	1140	15,2	181,0	1180	13,7	163,0	1370	14,1
	3. Tier	216,0	1340	14,8	195,0	1450	14,1	173,0	1580	11,3
	4. Tier	182,0	1630	18,5	195,0	1840	17,3	179,0	1980	13,7
Rind	1. Tier	252,0	2400	58,1	268,0	2490	59,2	278,0	2590	65,7
	2. Tier	315,0	1490	57,3	291,0	1770	55,7	310,0	1670	56,8
	3. Tier	293,0	1410	46,5	296,0	1650	47,3	260,0	1800	45,7
	4. Tier	274,0	1680	55,8	279,0	1960	57,4	285,0	2090	61,6
Ziege	1. Tier	180,0	1520	41,7	195,0	1600	40,8	227,0	1680	45,1
	2. Tier	241,0	865	29,1	187,0	874	30,3	177,0	983	34,4

DM: Decemetsche Membran; E: Epithel; M: Messung; S: Stroma

**Tab. A1:** Fortsetzung: Messdaten M4 bis M5 und Mittelwert.

		M4			M5			MW		
		E	S	DM	E	S	DM	E	S	DM
<b>Katze</b>	<b>1. Tier</b>	70,2	1690	40,7	56,0	1610	48,8	79,1	1664	40,2
	<b>2. Tier</b>	92,2	1995	23,2	65,3	1990	27,4	99,5	1995	22,4
	<b>3. Tier</b>	78,9	982	37,8	54,6	961	39,9	85,2	993	35,8
	<b>4. Tier</b>	83,5	1364	36,9	58,4	1333	31,4	84,8	1340	33,5
<b>Hund</b>	<b>1. Tier</b>	89,8	1560	63,2	85,2	1610	69,1	104,4	1556	57,1
	<b>2. Tier</b>	112,0	1890	79,9	76,3	2170	103,0	130,9	1736	75,9
	<b>3. Tier</b>	150,0	1010	43,2	144,0	1080	44,5	138,2	1002	41,5
<b>Pferd</b>	<b>1. Tier</b>	365,0	2030	127,0	349,0	2200	133,0	352,6	1946	121,2
	<b>2. Tier</b>	232,0	1103	98,7	169,0	1320	102,0	227,8	994	97,5
	<b>3. Tier</b>	255,0	1420	102,0	226,0	1780	135,0	268,8	1190	107,1
	<b>4. Tier</b>	294,0	1387	116,0	284,0	1529	129,0	295,0	1209	110,5
<b>Schwein</b>	<b>1. Tier</b>	127,0	2700	26,2	109,0	2900	29,3	135,2	2712	22,5
	<b>2. Tier</b>	137,0	1800	17,7	120,0	1970	18,3	160,6	1492	15,9
	<b>3. Tier</b>	148,0	1660	16,8	122,0	1810	22,3	170,8	1568	15,9
	<b>4. Tier</b>	154,0	2110	20,2	117,0	2430	22,9	165,4	1998	18,5
<b>Rind</b>	<b>1. Tier</b>	291,0	2730	67,2	246,0	3010	70,0	267,0	2644	64,0
	<b>2. Tier</b>	298,0	1850	61,3	225,0	2040	63,8	287,8	1764	59,0
	<b>3. Tier</b>	275,0	1760	57,9	273,0	1970	64,2	279,4	1718	52,3
	<b>4. Tier</b>	298,0	2270	63,8	256,0	2600	66,3	278,4	2120	61,0
<b>Ziege</b>	<b>1. Tier</b>	167,0	1870	49,9	159,0	2080	52,3	185,6	1750	46,0
	<b>2. Tier</b>	159,0	1250	36,8	152,0	1480	33,8	183,2	1090	32,9

DM: Decemetsche Membran; E: Epithel; M: Messung; MW: Mittelwert; S: Stroma

**Tab. A1:** Fortsetzung: Mittelwert gesamt und Standardabweichung.

		MW gesamt			Stabw		
		E	S	DM	E	S	DM
Katze	1. Tier	87,2	1298	33,0	7,5	372	6,6
	2. Tier						
	3. Tier						
	4. Tier						
Hund	1. Tier	124,5	1431	58,2	14,5	312	14,1
	2. Tier						
	3. Tier						
Pferd	1. Tier	286,1	1335	109,1	45,3	363	8,5
	2. Tier						
	3. Tier						
	4. Tier						
Schwein	1. Tier	158,0	1943	18,2	13,7	484	2,7
	2. Tier						
	3. Tier						
	4. Tier						
Rind	1. Tier	278,2	2062	59,1	7,4	371	4,3
	2. Tier						
	3. Tier						
	4. Tier						
Ziege	1. Tier	184,4	1420	39,4	1,2	330	6,5
	2. Tier						

DM: Decemetsche Membran; E: Epithel; MW: Mittelwert; S: Stroma; Stabw: Standardabweichung

**Tab. A2:** Übersicht der Expression von CK2 in den einzelnen Schichten des Hornhautepithels. Dargestellt ist die Intensität der Reaktion. (-- negativ, +/- schwach, + moderat, ++ deutlich, +++ stark).

	<i>Stratum basale</i>	<i>Stratum intermedium</i>	<i>Stratum superficiale</i>
Schwein	-	-	+/-
Pferd	-	-	+
Rind	+	-	+
Ziege	-	-	+
Hund	+/-	++	+++
Katze	+/-	++	+++



**Tab. A3:** PCNA-positive epitheliale Basalzellen.

	3 x 100 Zellen												MW	Stabw
	1.Tier			2. Tier			3. Tier			4. Tier				
	L	P	Z	L	P	Z	L	P	Z	L	P	Z		
Schwein	4	3	1	5	2	0	7	3	0	6	3	1	2,9	2,2
Pferd	19	12	8	15	12	9	12	10	9	15	9	8	11,5	3,3
Rind	5	7	4	8	5	2	3	1	0	4	3	1	3,6	2,3
Ziege	3	2	0	3	4	0	-	-	-	-	-	-	2,0	1,5
Hund	3	6	10	5	7	8	5	5	6	-	-	-	6,1	1,9
Katze	15	10	8	10	7	6	7	5	4	18	16	11	9,8	4,3

L: Limbus; MW: Mittelwert; P: Peripherie, Stabw: Standardabweichung; Z: Zentrum

**Tab. A4:** PHH3-positive epitheliale Basalzellen.

	3 x 100 Zellen												MW	Stabw
	1.Tier			2. Tier			3. Tier			4. Tier				
	L	P	Z	L	P	Z	L	P	Z	L	P	Z		
Schwein	1	3	1	1	2	0	2	1	0	1	1	0	1,1	0,9
Pferd	3	1	1	2	1	0	1	2	0	2	1	1	1,3	0,9
Rind	2	0	2	1	1	0	3	2	2	2	1	1	1,4	0,9
Ziege	2	0	1	2	2	0	-	-	-	-	-	-	1,2	1,0
Hund	1	0	0	1	1	0	0	0	0	-	-	-	0,3	0,5
Katze	1	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0,5	0,7

L: Limbus; MW: Mittelwert; P: Peripherie, Stabw: Standardabweichung; Z: Zentrum

## 10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Amselgruber für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die stets gewährte persönliche Unterstützung während der Durchführung der Untersuchungen und Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Für die Übernahme und Vorlage der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wanke.

Herrn PD Dr. Steffl danke ich sehr für die wissenschaftliche Betreuung und seinen fachkundigen und freundlichen Rat bei der Korrektur dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Schweiger für seine Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit und bei technischen Fragen danken.

Ferner gilt mein Dank für die Gewinnung des Probenmaterials und der Überlassung der Tiere Herrn PD Dr. Steffl, Frau Dr. Nautscher und dem Team der Tierklinik der Universität Hohenheim. Im gleichen Maße danke ich der Metzgerei Beerwart in Waiblingen und Vogelmann in Bubenorbis.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Müller und Frau Kallenberger für ihre freundliche Anleitung zur Durchführung der Laborarbeiten und ihre tatkräftige Unterstützung, sowie Frau Ivanova und den übrigen Mitarbeitern des Instituts und der Tierklinik für das nette Arbeitsklima.

Ich danke meinen Promotionskollegen sehr für die ständige gegenseitige Unterstützung, den konstruktiven Austausch und ihre Freundschaft.

Ein besonderer Dank gilt Andrea für ihre konstruktiven Anregungen und ihre tatkräftige Unterstützung. Mein größter Dank gilt meinem Vater, der mir sehr große Freiheiten gewährt hat und mit großzügiger Unterstützung jederzeit zur Seite stand, um meine Ziele zu verwirklichen.